

**Immunogenic composition for the treatment and diagnosis of cancer comprises an anti-VEGF (vascular endothelial growth factor) antibody binding the same epitope as the monoclonal antibody ATCC PTA 1595**

**Patent Assignee:** UNIV TEXAS SYSTEM

**Inventors:** BREKKEN R A; BREKKEN R A D; THORPE P E

**Patent Family (29 patents, 91 countries)**

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
WO 2000064946	A2	20001102	WO 2000US11367	A	20000428	200067	B
AU 200048049	A	20001110	AU 200048049	A	20000428	200109	E
US 6342219	B1	20020129	US 1999131432	P	19990428	200210	E
			US 2000561500	A	20000428		
US 6342221	B1	20020129	US 1999131432	P	19990428	200210	E
			US 2000561108	A	20000428		
EP 1179541	A1	20020213	EP 2001125821	A	20000428	200219	E
EP 1185559	A2	20020313	EP 2000930183	A	20000428	200225	E
			WO 2000US11367	A	20000428		
			EP 2001125821	A	20000428		
BR 200010017	A	20020611	BR 200010017	A	20000428	200248	E
			WO 2000US11367	A	20000428		
US 6416758	B1	20020709	US 1999131432	P	19990428	200253	E
			US 2000561526	A	20000428		
US 20020119153	A1	20020829	US 1999131432	P	19990428	200259	E
			US 2000561108	A	20000428		
			US 2001998831	A	20011130		
KR 2002019905	A	20020313	KR 2001713746	A	20011026	200263	E
ZA 200108285	A	20020828	ZA 20018285	A	20011009	200264	E
ZA 200108612	A	20020828	ZA 20018612	A	20011009	200264	E
CN 1358197	A	20020710	CN 2000809417	A	20000428	200278	E
JP 2002543093	W	20021217	JP 2000614295	A	20000428	200312	E
			WO 2000US11367	A	20000428		
US 6524583	B1	20030225	US 1999131432	P	19990428	200323	E
			US 2000561499	A	20000428		

AU 763954	B	20030807	AU 200048049	A	20000428	200362	E
US 20030175276	A1	20030918	US 1999131432	P	19990428	200362	E
			US 2000561499	A	20000428		
			US 2003373561	A	20030224		
MX 2001010891	A1	20021101	WO 2000US11367	A	20000428	200376	E
			MX 200110891	A	20011026		
NZ 514918	A	20031128	NZ 514918	A	20000428	200382	E
			WO 2000US11367	A	20000428		
US 6676941	B2	20040113	US 1999131432	P	19990428	200405	E
			US 2000561108	A	20000428		
			US 2001998831	A	20011130		
US 6703020	B1	20040309	US 1999131432	P	19990428	200418	E
			US 2000561005	A	20000428		
EP 1179541	B1	20040616	EP 2000930183	A	20000428	200439	E
			EP 2001125821	A	20000428		
DE 60011612	E	20040722	DE 60011612	A	20000428	200450	E
			EP 2001125821	A	20000428		
ES 2223705	T3	20050301	EP 2001125821	A	20000428	200519	E
US 6887468	B1	20050503	US 1999131432	P	19990428	200530	E
			US 2000562245	A	20000428		
US 20050123537	A1	20050609	US 1999131432	P	19990428	200538	E
			US 2000561005	A	20000428		
			US 2003738404	A	20031217		
DE 60011612	T2	20050707	DE 60011612	A	20000428	200550	E
			EP 2001125821	A	20000428		
US 7056509	B2	20060606	US 1999131432	P	19990428	200638	E
			US 2000561499	A	20000428		
			US 2003373561	A	20030224		
MX 235012	B	20060317	WO 2000US11367	A	20000428	200651	E
			MX 200110891	A	20011026		

**Priority Application Number (Number Kind Date):** US 2003738404 A 20031217; US 2003373561 A 20030224; US 2001998831 A 20011130; US 2000562245 A 20000428; US 2000561526 A 20000428; US 2000561500 A 20000428; US 2000561499 A 20000428; US 2000561108 A 20000428; US 2000561005 A 20000428; US 1999131432 P 19990428

Patent Details					
Patent Number	Kind	Language	Pages	Drawings	Filing Notes
WO 2000064946	A2	EN	93	4	
National Designated States,Original	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH CN CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG UZ VN YU ZA ZW				
Regional Designated States,Original	AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW NL OA PT SD SE SL SZ TZ UG ZW				
AU 200048049	A	EN			Based on OPI patent WO 2000064946
US 6342219	B1	EN			Related to Provisional US 1999131432
US 6342221	B1	EN			Related to Provisional US 1999131432
EP 1179541	A1	EN			
Regional Designated States,Original	AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI				
EP 1185559	A2	EN			PCT Application WO 2000US11367
					Related to application EP 2001125821
					Related to patent EP 1179541
					Based on OPI

					patent WO 2000064946
Regional Designated States,Original	AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI				
BR 200010017	A	PT			PCT Application WO 2000US11367
					Based on OPI patent WO 2000064946
<u>US 6416758</u>	B1	EN			Related to Provisional US 1999131432
<u>US 20020119153</u>	A1	EN			Related to Provisional US 1999131432
					Continuation of application US 2000561108
ZA 200108285	A	EN	329		
ZA 200108612	A	EN	339		
JP 2002543093	W	JA	349		PCT Application WO 2000US11367
					Based on OPI patent WO 2000064946
<u>US 6524583</u>	B1	EN			Related to Provisional US 1999131432
AU 763954	B	EN			Previously issued patent AU 200048049



					Based on OPI patent WO 2000064946
<u>US 20030175276</u>	A1	EN			Related to Provisional US 1999131432
					Continuation of application US 2000561499
					Continuation of patent US 6524583
MX 2001010891	A1	ES			PCT Application WO 2000US11367
					Based on OPI patent WO 2000064946
NZ 514918	A	EN			PCT Application WO 2000US11367
					Based on OPI patent WO 2000064946
<u>US 6676941</u>	B2	EN			Related to Provisional US 1999131432
					Continuation of application US 2000561108
					Continuation of patent US 6342221
<u>US 6703020</u>	B1	EN			Related to Provisional

					US 1999131432
<u>EP 1179541</u>	B1	EN			Division of application EP 2000930183
					Division of patent EP 1185559
Regional Designated States, Original	AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE				
DE 60011612	E	DE			Application EP 2001125821
					Based on OPI patent EP 1179541
ES 2223705	T3	ES			Application EP 2001125821
					Based on OPI patent EP 1179541
<u>US 6887468</u>	B1	EN			Related to Provisional US 1999131432
<u>US 20050123537</u>	A1	EN			Related to Provisional US 1999131432
					Division of application US 2000561005
					Division of patent US 6703020
DE 60011612	T2	DE			Application EP

					2001125821
					Based on OPI patent EP 1179541
US 7056509	B2	EN			Related to Provisional US 1999131432
					Continuation of application US 2000561499
					Continuation of patent US 6524583
MX 235012	B	ES			PCT Application WO 2000US11367
					Based on OPI patent WO 2000064946

**Alerting Abstract: WO A2**

**NOVELTY** - A composition (I) comprising a biologically effective amount of an anti-VEGF (vascular endothelial growth factor) antibody or antigen binding fragment that binds to substantially to the same epitope as the monoclonal antibody ATCC PTA 1595, is new.

**DESCRIPTION** - A composition (I) comprising a biologically effective amount of an anti-VEGF antibody or antigen binding fragment that binds to substantially to the same epitope as the monoclonal antibody ATCC PTA 1595 and which significantly inhibits VEGF binding to the VEGF receptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) without inhibiting VEGF binding to the VEGF receptor VEGFR1 (Flt-1).

**INDEPENDENT CLAIMS** are also included for the following:

1.a composition (II) comprising a biologically effective amount of an anti-VEGF antibody or antigen binding fragment that binds to substantially to the same epitope as the monoclonal antibody 2C3 (ATCC PTA 1595) for use in inhibiting angiogenesis without substantial inhibition of macro phages, osteoclasts or chondroclasts; 2.a kit comprising (I); 3.a hybridoma producing the monoclonal antibody in (I); 4.monoclonal antibody ATCC PTA 1595; 5.a method for preparing an anti-VEGF antibody or antigen binding fragment that binds to substantially to the

same epitope as the monoclonal antibody ATCC PTA 1595 comprising immunizing a non-human animal with an immunizing composition comprising at least a first immunogenic VEGF component and selecting from the immunized animal an antibody that substantially cross-reacts with ATCC PTA 1595; 6.a method of detecting VEGF comprising contacting a composition suspected of containing VEGF with (I) allowing formation of a VEGF/antibody complex and detecting the complex; 7.a method of inhibiting VEGF binding to the VEGF receptor VEGFR2 without significantly inhibiting VEGF to the VEGF receptor VEGFR1 comprising contacting a homo- or heterogeneous population of cells that express VEGFR2 (KDR-Flk-1) and VEGFR1 (Flt-1) with a biologically effective amount of (I); 8.a method for specifically inhibiting VEGF-induced endothelial cell proliferation comprising contacting a population of endothelial cells with a biologically effective amount of (I); 9.a method for specifically inhibiting VEGF-induced endothelial cell proliferation without significantly inhibiting VEGF-stimulated macrophage, osteoclast or chondroclast function comprising contacting a tissue containing endothelial cells and at least one of macrophages, osteoclasts or chondroclasts with a biologically effective amount of (I); 10.a method of inhibiting angiogenesis comprising contacting a population of potentially angiogenic blood vessels with an anti-angiogenic composition comprising a biologically effective amount of (I); 11.a method for treating an angiogenic disease comprising administering to an animal with an angiogenic disease at least a first pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of (I); 12.a method for delivering a diagnostic or therapeutic agent to a vascularized tumor comprising administering to an animal with a vascularized tumor a biologically effective amount of (I); 13.a method for treating cancer comprising administering at least a first pharmaceutical composition to an animal that has, or is at risk of developing a vascularized solid tumor, a metastatic tumor or metastases from a primary tumor where the first pharmaceutical composition is (I); and 14.a method for treating cancer comprising: 1.administering (I) to an animal that has a vascularized solid tumor, a metastatic tumor or metastases from a primary tumor, localizing the antibody of the composition to the tumor vasculature or stroma; and 2.subsequently administering to the animal a second composition that comprises a substantially inactive prodrug that is cleaved by the biological agent attached to the antibody in the first composition, releasing a substantially active drug within the tumor vasculature or stroma.

**ACTIVITY** - Cytostatic; antiproliferative.

**USE** - The composition is useful for the treatment and diagnosis of cancer, especially vascularized solid tumors. It is also useful in the manufacture of a medicament for treating cancer by inhibiting VEGF binding to the VEGF receptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) without inhibiting VEGF binding to the VEGF receptor VEGFR1 (Flt-1) (claimed). The composition may also be used to detect VEGF in a sample.

### **Technology Focus:**

**BIOLOGY** - Preferred Antibody: The antibody is IgG, IgM, scFv, Fv, Fab', Fab, diabody, linear antibody or F(ab')<sub>2</sub> antigen-binding fragment of an antibody. The antibody is a dimer, trimer or multimer, is human, humanized part-human, chimeric or a recombinant antibody. In addition it comprises an antigen-binding region attached to a human antibody framework or constant region.

The antibody comprises a first variable region including a fully defined 127, 115 amino acid sequence (given in the specification). The antibody is attached to at least a first biological agent especially one which cleaves a substantially inactive prodrug to release a substantially active drug, preferably an alkaline phosphatase that cleaves a substantially inactive phosphate pro-drug. The antibody may also be attached to at least a first therapeutic or diagnostic agent.

**Preparation:** The antibodies in the composition are prepared by standard recombinant and hybridoma technologies.

**Preferred Agent:** The therapeutic agent is a chemotherapeutic, radiotherapeutic, anti-angiogenic (especially angiopoietin-2, endostatin, angiostatin, vasculostatin, canstatin or maspin), apoptosis-inducing, steroid, antimetabolite, anthracycline, vinca alkaloid, anti-tubulin (especially colchicine, taxol, vinblastine, vincristine, vindesine or a combretastatin), a coagulant (especially, Factor II(a), Factor VII(a), Factor IX(a), Factor x(a) a vitamin K-dependent coagulant that lacks the Gla modification, Russell's viper venom Factor X activator, thromboxane A2, thromboxane A2 synthase or alpha2-antiplasmin), Tissue Factor (TF) (especially a human TF, a mutant TF deficient in the ability to activate Factor VII, a di-, tri- or polymeric TF or derivative or especially a truncated TF), antibiotic, cytokine, alkylating or coagulating agent. The antibody is attached to a cytotoxic, cytostatic, or anticellular agent capable of killing or suppressing the growth or cell division of endothelial cells, a plant-, fungus- or bacteria-derived toxin, an A chain toxin, a ribosome inactivating protein, alpha-sarcin, gelonin, aspergillin, restrictocin, a ribonuclease, an epipodophyllotoxin, diphtheria toxin or ~Pseudomonas ~ toxin. The antibody may also be attached to a (deglycosylated) ricin A chain.

**Preferred Detection Agent:** The antibody is attached to a diagnostic, imaging or detectable agent especially an X-ray detectable compound, a radioactive ion or a nuclear magnetic spin-resonance isotope. the antibody may also be bound to biotin, avidin or an enzyme that generates a colored product upon contact with a chromogenic substrate.

**Preferred Method:** The antibody is attached to the biological agent as a fusion protein prepared by expressing a recombinant vector that comprises in the same reading frame DNA segments encoding the antibody and biological agent. the antibody may be attached to the biological agent via a biologically resealable bond or selectively cleavable linker especially one comprising a cleavage site for (pro-)urokinase, plasmin, plasminogen, TGFbeta, staphylokinase, Thrombin, Factor IXa, Factor Xa, a metalloprotease, an interstitial collagenase, a gelatinase or a stromelysin. The non-human animal is a transgenic mouse comprising a human antibody library. The immunization process comprises:

- 1.administering (I) to a non-human animal;
- 2.preparing a combinatorial immunoglobulin phagemid library expressing RN A isolated from the spleen of the immunized animal;
- 3.selecting from the library a clone expressing an anti-VEGF antibody whi ch substantially cross-reacts with the monoclonal antibody 2C3 (ATCC PT A 1595); and
- 4.expressing the anti VEGF antibody-encoding nucleic acids from the clone to provide a recombinant anti-VEGF antibody.

**International Classification (Main):** A61K-039/395, C07K-016/00, C07K-016/28 **(Additional/Secondary):** A61K-038/18, A61K-045/00, A61P-027/02, A61P-035/00, A61P-043/00, A61P-009/10, C07K-016/30, C12N-015/02, C12N-015/13, C12N-005/02, C12N-005/10, C12N-005/20, G01N-033/577, A61K-047/48, C12P-021/08

#### International Patent Classification

IPC	Level	Value	Position	Status	Version
A61K-0039/395	A	I	F	B	20060101
A61K-0039/395	A	I		R	20060101
A61K-0047/48	A	I		R	20060101
C07K-0014/52	A	I		R	20060101
C07K-0016/00	A	I	L	B	20060101
C07K-0016/22	A	I		R	20060101
C07K-0016/24	A	I		R	20060101
C07K-0005/103	A	I		R	20060101
C12P-0021/08	A	I	L	B	20060101
A61K-0039/395	C	I		R	20060101
A61K-0047/48	C	I		R	20060101
C07K-0014/435	C	I		R	20060101
C07K-0016/18	C	I		R	20060101
C07K-0005/00	C	I		R	20060101

**US Classification, Issued:** 424145100, 530388240, 424133100, 424145100, 435007200, 424143100, 424001490, 424178100, 424145100, 424133100, 424134100, 424135100, 424141100, 424142100, 424143100, 435069100, 435335000, 435810000, 530387100, 530387300, 530388100, 530388150, 530388230, 530391100, 530391300, 530391500, 530391700, 530809000, 530864000, 530865000, 530866000, 424178100, 424130100, 424179100, 424181100, 424183100, 424193100, 424195110, 424001490, 424001530, 424009300, 424009340, 424009600, 435007210, 435069100, 435070210, 435810000, 435007230, 435007100, 530391100, 530391300, 530391500, 530391700, 530391900, 424145100, 424001490, 424001530, 424001690, 424009200, 424009300, 424133100, 424134100, 424135100, 424141100, 424142100, 424145100, 424178100, 424179100, 424181100, 424183100, 424195110, 435007230, 435069100, 435069600, 435069700, 435070210, 435810000, 530387300, 530388100, 530388150, 530388240, 530391300, 530391700, 530391900, 424145100, 424133100, 424135100, 424141100, 530387100, 530388100, 530388150, 530388250, 530809000, 530864000, 530865000, 530866000, 424178100, 424130100, 424179100, 424181100, 424183100, 424193100, 424195110,

424001490, 424001530, 424009300, 424009340, 424009600, 424007210, 435007100, 435007200, 435007300, 435810000, 530391100, 530391300, 530391500, 530391700, 530391900, 424178100, 424130100, 424145100, 424156100, 424158100, 530387100, 530388200, 424130100, 424139100, 424143100, 424145100, 530388100, 424145100, 424130100, 424133100, 424184100, 530387100, 530388100, 530388150, 530388250, 530809000, 530864000, 530865000, 530866000

### **Original Publication Data by Authority**

#### **Australia**

Publication Number: AU 200048049 A (Update 200109 E)

Publication Date: 20001110

Assignee: UNIV TEXAS SYSTEM; US (TEXA)

Language: EN

Application: AU 200048049 A 20000428 (Local application)

Priority: US 1999131432 P 19990428

Related Publication: WO 2000064946 A (Based on OPI patent )

Current IPC: A61K-39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/435(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/52(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/18(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-16/22(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-5/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-5/103(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)|AU 763954 B (Update 200362 E)

Publication Date: 20030807

Assignee: UNIV TEXAS SYSTEM; US (TEXA)

Language: EN

Application: AU 200048049 A 20000428 (Local application)

Priority: US 1999131432 P 19990428

Related Publication: AU 200048049 A (Previously issued patent) WO 2000064946 A (Based on OPI patent )

Current IPC: A61K-39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/435(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/52(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/18(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-16/22(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-5/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-5/103(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

#### **Brazil**

Publication Number: BR 200010017 A (Update 200248 E)

Publication Date: 20020611

Assignee: UNIV TEXAS SYSTEM (TEXA)

Inventor: THORPE P E BREKKEN R A

Language: PT

Application: BR 200010017 A 20000428 (Local application) WO 2000US11367 A 20000428 (PCT Application)

Priority: US 1999131432 P 19990428

Related Publication: WO 2000064946 A (Based on OPI patent )

Current IPC: A61K-39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-

39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/435(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/52(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/18(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-16/22(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-5/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-5/103(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

### **China**

Publication Number: CN 1358197 A (Update 200278 E)

Publication Date: 20020710

Assignee: UNIV TEXAS SYSTEM; US (TEXA)

Language: ZH

Application: CN 2000809417 A 20000428 (Local application)

Priority: US 1999131432 P 19990428

Original IPC: C07K-16/28(A) A61K-38/18(B) A61K-39/395(B) A61P-35/00(B) C12N-5/20(B) C12N-15/13(B) G01N-33/577(B)

Current IPC: A61K-39/395(R,A,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/435(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/52(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/18(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-16/22(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-5/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-5/103(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

### **Germany**

Publication Number: DE 60011612 E (Update 200450 E)

Publication Date: 20040722

**\*\*Zusammensetzungen und Verfahren zur Krebsbehandlung durch die selektive Hemmung von VEGF\*\***

Assignee: UNIV TEXAS SYSTEM; US (TEXA)

Language: DE

Application: DE 60011612 A 20000428 (Local application) EP 2001125821 A 20000428 (Application)

Priority: US 1999131432 P 19990428

Related Publication: EP 1179541 A (Based on OPI patent )

Original IPC: C07K-16/28(A) A61K-38/18(B) A61K-39/395(B) A61P-35/00(B) C12N-5/20(B) C12N-15/13(B) G01N-33/577(B)

Current IPC: C07K-16/28(A) A61K-38/18(B) A61K-39/395(B) A61P-35/00(B) C12N-15/13(B) C12N-5/20(B) G01N-33/577(B)|DE 60011612 T2 (Update 200550 E)

Publication Date: 20050707

Assignee: UNIV TEXAS SYSTEM; US (TEXA)

Inventor: BREKKEN R A THORPE P E

Language: DE

Application: DE 60011612 A 20000428 (Local application) EP 2001125821 A 20000428



(Application)

Priority: US 1999131432 P 19990428

Related Publication: EP 1179541 A (Based on OPI patent )

Original IPC: C07K-16/28(A) A61K-38/18(B) A61K-39/395(B) A61P-35/00(B) C12N-5/20(B) C12N-15/13(B) G01N-33/577(B)

Current IPC: C07K-16/28(A) A61K-38/18(B) A61K-39/395(B) A61P-35/00(B) C12N-15/13(B) C12N-5/20(B) G01N-33/577(B)

### **European Patent Office**

Publication Number: EP 1179541 A1 (Update 200219 E)

Publication Date: 20020213

**\*\*Zusammensetzungen und Verfahren zur Krebsbehandlung durch die selektive Hemmung von VEGF** Compositions and methods for cancer treatment by selectively inhibiting VEGF

Compositions et procedes de traitement du cancer par l'inhibition selective du VEGF\*\*

Assignee: BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM, Office of General Council, 201 West 7th Street, Austin, Texas 78701, US (TEXA)

Agent: Gowshall, Jonathan Vallance, FORRESTER BOEHMERT Pettenkoferstrasse 20-22, 80336 Munchen, DE

Language: EN

Application: EP 2001125821 A 20000428 (Local application)

Priority: US 1999131432 P 19990428

Designated States: (Regional Original) AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI

Original IPC: C07K-16/28(A) A61K-38/18(B) A61K-39/395(B) A61P-35/00(B) C12N-5/20(B) C12N-15/13(B) G01N-33/577(B)

Current IPC: A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/435(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/52(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/18(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-16/22(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-5/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-5/103(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

Original Abstract: Disclosed are antibodies that specifically inhibit VEGF binding to only one (VEGFR2) of the two VEGF receptors. The antibodies effectively inhibit angiogenesis and induce tumor regression, and yet have improved safety due to their specificity. The present invention thus provides new antibody-based compositions, methods and combined protocols for treating cancer and other angiogenic diseases. Advantageous immunoconjugate and prodrug compositions and methods using the new VEGF-specific antibodies are also provided.

Claim: 1.A composition comprising a biologically effective amount of an immunoco njugate that comprises an anti-VEGF antibody, or antigen-binding fragme nt thereof, operatively attached to at least a first biological agent; wherein said antibody or antigen-binding fragment thereof binds to subs tantially the same epitope as the monoclonal antibody ATCC PTA 1595 and significantly inhibits VEGF binding to the VEGF receptor VEGFR2 (KDR/F lk-1) without significantly inhibiting VEGF binding to the VEGF recepto r VEGFR1 (Flt-1).|EP 1179541 B1 (Update 200439 E)

Publication Date: 20040616

**\*\*Zusammensetzungen und Verfahren zur Krebsbehandlung durch die selektive Hemmung von**

VEGF Compositions and methods for cancer treatment by selectively inhibiting VEGF

Compositions et procedes de traitement du cancer par l'inhibition selective du VEGF\*\*

Assignee: BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM, Office of the General Counsel, 201 West 7th Street, Austin, Texas 78701, US (TEXA)

Inventor: BREKKEN R A D Thorpe, Philip Edward Dr., 5311 Nakoma Drive, Dallas, Texas 75209, US

Agent: Gowshall, Jonathan Vallance, FORRESTER BOEHMERT, Pettenkoferstrasse 20-22, 80336 Munchen, DE

Language: EN

Application: EP 2000930183 A 20000428 (Division of application) EP 2001125821 A 20000428 (Local application)

Priority: US 1999131432 P 19990428

Related Publication: EP 1185559 A (Division of patent)

Designated States: (Regional Original) AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

Original IPC: C07K-16/28(A) A61K-38/18(B) A61K-39/395(B) A61P-35/00(B) C12N-5/20(B) C12N-15/13(B) G01N-33/577(B)

Current IPC: A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/435(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/52(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/18(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-16/22(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-5/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-5/103(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

Claim: 1.Eine Zusammensetzung, umfassend eine biologisch wirksame Menge eines au fgereinigten Anti-VEGF-Antikorpers oder eines Antigen-bindenden Fragmen ts davon, der an im wesentlichen dasselbe Epitop wie der monoklonale An tikorper ATCC PTA 1595 bindet und der signifikant die VEGF-Bindung an d en VEGF-Rezeptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibiert, ohne signifikant die VEG F-Bindung an den VEGF-Rezeptor VEGFR1 (Flt-1) zu inhibieren. 1.A composition comprising a biologically effective amount of a purified anti-VEGF antibody, or antigen-binding fragment thereof, that binds to substantially the same epitope as the monoclonal antibody ATCC PTA 1595 and that significantly inhibits VEGF binding to the VEGF receptor VEGF R2 (KDR/Flk-1) without significantly inhibiting VEGF binding to the VEG F receptor VEGFR1 (Flt-1). 1.Composition comprenant une quantite biologiquement efficace d'un antico rps anti-VEGF purifie, d'un de ses fragments de liaison d'antigene, qui se lie pratiquement au meme epitope que l'anticorps monoclonal ATCC PA T 1595 et qui inhibe de maniere significative la liaison du VEGF au rec epteur de VEGF VEGFR2 (KDR/Flk-1) sans inhiber de maniere significative la liaison du VEGF au recepteur de VEGF VEGFR1 (Flt-1).|EP 1185559 A2 (Update 200225 E)

Publication Date: 20020313

\*\*ZUSAMMENSETZUNGEN UND V ERFAHREN ZUR KREBSBEHANDLUNG DURCH DIE SELEKTIVE HEMMUNG VON VEGF COMPO SITIONS AND METHODS FOR CANCER TREATMENT BY SELECTIVELY INHIBITING VEGF COMPOSITIONS ET PROCEDES DE TRAITEMENT DU CANCER PAR INHIBITION SELECT IVE DE VEGF\*\*

Assignee: BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTE M, Office of General Council, 201 West 7th Street, Austin, Texas 78701, US

Inventor: THORPE, Philip, Edward, 5311 Nakoma Drivelevard, Dallas, TX 75209, US

BREKKEN, Rolf, A., 14304 25th Avenue NE, Seattle, WA 98125 , US

Agent: Gowshall, Jonathan Vallance, FORRESTER BOEHMERT, Pettenkof erstrasse 20-22,  
80336 Munchen, DE

Language: EN

Application: EP 2000930 183 A 20000428 (Local application) WO 2000US11367 A 20000428  
(PCT Appli cation) EP 2001125821 A 20000428 (Related to application)

Priority: US 1999131432 P 19990428

Related Publication: EP 1179541 A (Related to pa tent) WO 2000064946 A (Based on OPI  
patent )

Designated States: (Regio nal Original) AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI  
LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI

Original IPC: C07K-16/28(A) A61K-38/18(B) A61K-39/395 (B) A61P-35/00(B) C12N-5/20(B)  
C12N-15/13(B) G01N-33/577(B)

Current IPC: A61K-39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-  
39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-  
47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/435(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-  
14/52(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/18(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-  
16/22(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-5/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-  
5/103(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

Original Abstract: Disclosed are antibodies that specifically inhibit VEGF binding to only one  
(VEGFR2) of the two VEGF receptors. The antibodies effectively inhibit angiogenesis and  
induce tumor regression, and yet have improved safety due to their specificity. The present  
invention thus provides new antibody-based compositions, methods and combined protocols for  
treating cancer and other angiogenic diseases. Advantageous immunoconjugate and prodrug  
compositions and methods using the new VEGF-specific antibodies are also provided.

### **Spain**

Publication Number: ES 2223705 T3 (Update 200519 E)

Publication Date: 20050301

Assignee: UNIV TEXAS SYSTEM (TEXA)

Language: ES

Application: EP 2001125821 A 20000428 (Application)

Priority: US 1999131432 P 19990428

Related Publication: EP 1179541 A (Based on OPI patent )

Original IPC: C07K-16/28(A) A61K-38/18(B) A61K-39/395(B) A61P-35/00(B) C12N-5/20(B)  
C12N-15/13(B) G01N-33/577(B)

Current IPC: A61K-39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-  
39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-  
47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/435(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-  
14/52(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/18(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-  
16/22(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-5/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-  
5/103(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

### **Japan**

Publication Number: JP 2002543093 W (Update 200312 E)

Publication Date: 20021217

Language: JA (349 pages)

Application: JP 2000614295 A 20000428 (Local application) WO 2000US11367 A 20000428 (PCT Application)

Priority: US 1999131432 P 19990428

Related Publication: WO 2000064946 A (Based on OPI patent )

Original IPC: A61K-39/395(A) A61K-45/00(B) A61K-47/48(B) A61P-9/10(B) A61P-27/02(B) A61P-35/00(B) A61P-43/00(B) C07K-16/30(B) C12N-5/02(B) C12N-5/10(B) C12N-15/02(B) C12P-21/08(B)

Current IPC: A61K-39/395(A) A61K-45/00(B) A61K-47/48(B) A61P-27/02(B) A61P-35/00(B) A61P-43/00(B) A61P-9/10(B) C07K-16/30(B) C12N-15/02(B) C12N-5/02(B) C12N-5/10(B) C12P-21/08(B)

### **Republic of Korea**

Publication Number: KR 2002019905 A (Update 200263 E)

Publication Date: 20020313

Assignee: UNIV TEXAS SYSTEM (TEXA)

Language: KO

Application: KR 2001713746 A 20011026 (Local application)

Priority: US 1999131432 P 19990428

Original IPC: A61K-39/395(A)

Current IPC: A61K-39/395(A)

### **Mexico**

Publication Number: MX 2001010891 A1 (Update 200376 E)

Publication Date: 20021101

Assignee: UNIV TEXAS SYSTEM (TEXA)

Inventor: THORPE P E BREKKEN R A

Language: ES

Application: WO 2000US11367 A 20000428 (PCT Application) MX 200110891 A 20011026 (Local application)

Priority: US 1999131432 P 19990428

Related Publication: WO 2000064946 A (Based on OPI patent )|MX 235012 B (Update 200651 E)

Publication Date: 20060317

Assignee: UNIV TEXAS SYSTEM (TEXA)

Inventor: THORPE P E BREKKEN R A

Language: ES

Application: WO 2000US11367 A 20000428 (PCT Application) MX 200110891 A 20011026 (Local application)

Priority: US 1999131432 P 19990428

Related Publication: WO 2000064946 A (Based on OPI patent )

Original IPC: A61K-39/395(A) A61P-35/00(B) C07K-16/28(B) C12N-15/13(B) C12N-5/20(B) G01N-33/577(B)

Current IPC: A61K-39/395(A) A61P-35/00(B) C07K-16/28(B) C12N-15/13(B) C12N-5/20(B) G01N-33/577(B)

#### **New Zealand**

Publication Number: NZ 514918 A (Update 200382 E)

Publication Date: 20031128

Assignee: UNIV TEXAS SYSTEM (TEXA)

Inventor: THORPE P E BREKKEN R A

Language: EN

Application: NZ 514918 A 20000428 (Local application) WO 2000US11367 A 20000428 (PCT Application)

Priority: US 1999131432 P 19990428

Related Publication: WO 2000064946 A (Based on OPI patent )

Original IPC: C07K-16/00(A) A61K-38/18(B) A61K-39/395(B) A61P-35/00(B) C07K-16/28(B) C12N-5/20(B) C12N-15/13(B) G01N-33/577(B)

Current IPC: C07K-16/00(A) A61K-38/18(B) A61K-39/395(B) A61P-35/00(B) C07K-16/28(B) C12N-15/13(B) C12N-5/20(B) G01N-33/577(B)

#### **United States**

Publication Number: US 20020119153 A1 (Update 200259 E)

Publication Date: 20020829

**\*\*Antibody conjugate formulations for selectively inhibiting VEGF\*\***

Assignee: Board of Regents, The University of Texas System, US (TEXA)

Inventor: Thorpe, Philip E., Dallas, TX, US Brekken, Rolf A., Seattle, WA, US

Agent: Shelley P.M. Fussey, WILLIAMS, MORGAN AMERSON, P.C., Suite 250, 7676 Hillmont, Houston, TX, US

Language: EN

Application: US 1999131432 P 19990428 (Related to Provisional) US 2000561108 A 20000428 (Continuation of application) US 2001998831 A 20011130 (Local application)

Original IPC: A61K-39/395(A) C07K-16/22(B)

Current IPC: A61K-39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/435(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/52(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/18(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-16/22(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/24(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-5/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-5/103(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

Original US Class (secondary): 424145.1 530388.24 424133.1

Original Abstract: Disclosed are antibodies that specifically inhibit VEGF binding to only one (VEGFR2) of the two VEGF receptors. The antibodies effectively inhibit angiogenesis and induce tumor regression, and yet have improved safety due to their specificity. The present invention thus provides new antibody-based compositions, methods and combined protocols for treating cancer and other angiogenic diseases. Advantageous immunoconjugate and prodrug compositions and methods using the new VEGF-specific antibodies are also provided.

Claim: What is claimed is: 1. **\*\*1\*\***. A composition comprising at least a first immunoconjugate comprising at least a first anti-VEGF antibody, or antigen-binding fragment thereof, that binds

to substantially the same epitope as the monoclonal antibody 2C3 (ATCC PTA 1595) operatively attached to at least a first biological agent.[US 20030175276 A1 (Update 200362 E)

Publication Date: 20030918

**\*\*Antibody methods for selectively inhibiting VEGF\*\***

Assignee: Board of Regents, The University of Texas System, US (TEXA)

Inventor: Thorpe, Philip E., Dallas, TX, US Brekken, Rolf A., Seattle, WA, US

Agent: Shelley P.M. Fussey, Ph.D., WILLIAMS, MORGAN AMERSON, P.C., 10333

Richmond, Suite 1100, Houston, TX, US

Language: EN

Application: US 1999131432 P 19990428 (Related to Provisional) US 2000561499 A 20000428

(Continuation of application) US 2003373561 A 20030224 (Local application)

Related Publication: US 6524583 A (Continuation of patent)

Original IPC: A61K-39/395(A) G01N-33/53(B) G01N-33/567(B)

Current IPC: A61K-39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-

39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-

47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/435(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-

14/52(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/18(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-

16/22(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/24(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-

5/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-5/103(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

Original US Class (secondary): 424145.1 4357.2

Original Abstract: Disclosed are antibodies that specifically inhibit VEGF binding to only one (VEGFR2) of the two VEGF receptors. The antibodies effectively inhibit angiogenesis and induce tumor regression, and yet have improved safety due to their specificity. The present invention thus provides new antibody-based compositions, methods and combined protocols for treating cancer and other angiogenic diseases. Advantageous immunoconjugate and prodrug compositions and methods using the new VEGF-specific antibodies are also provided.

Claim: What is claimed is: 1. 2. **\*\*1\*\***. A method of detecting VEGF, comprising contacting a composition suspected of containing VEGF with at least a first anti-VEGF antibody, or antigen-binding fragment thereof, that binds to substantially the same epitope as the monoclonal antibody 2C3 (ATCC PTA 1595), under conditions effective to allow the formation of VEGF/antibody complexes and detecting the complexes so formed.[US 20050123537 A1 (Update 200538 E)

Publication Date: 20050609

**\*\*Antibody conjugate methods for selectively inhibiting VEGF\*\***

Assignee: Board of Regents, The University of Texas System, US Thorpe, Philip E., Dallas, TX,

US Residence: US Nationality: US Brekken, Rolf A., Seattle, WA, US Residence: US

Nationality: US

Inventor: Thorpe, Philip E., Dallas, TX, US Residence: US Nationality: US Brekken, Rolf A.,

Seattle, WA, US Residence: US Nationality: US

Agent: Shelley P.M. Fussey, Ph.D., WILLIAMS, MORGAN AMERSON, P.C., 10333 Richm

ond, Suite 1100, Houston, TX, US

Language: EN

Application: US 199913143 2 P 19990428 (Related to Provisional) US 2000561005 A 20000428

(Division of application) US 2003738404 A 20031217 (Local application)

Related Publication: US 6703020 A (Division of patent)

Original IPC: A61K-39/395(A) A61K-39/40(B) A61K-51/00(B)  
Current IPC: A61K-39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/435(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/52(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/18(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-16/22(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-5/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-5/103(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

Original US Class (secondary): 424143.1 424149 424178.1

Original Abstract: Disclosed are antibodies that specifically inhibit VEGF binding to only one (VEGFR2) of the two VEGF receptors. The antibodies effectively inhibit angiogenesis and induce tumor regression, and yet have improved safety due to their specificity. The present invention thus provides new antibody-based compositions, methods and combined protocols for treating cancer and other angiogenic diseases. Advantageous immunoconjugate and prodrug compositions

Claim: 1.\*\*1\*\*.\*2\*\* (canceled)|US 6342219 B1 (Update 200210 E)

Publication Date: 20020129

\*\*Antibody compositions for selectively inhibiting VEGF.\*\*

Assignee: Board of Regents, The University of Texas System, Austin, TX, US

Inventor: Thorpe, Philip E., Dallas, TX, US Brekken, Rolf A., Seattle, WA, US

Agent: Williams, Morgan and Amerson

Language: EN

Application: US 1999131432 P 19990428 (Related to Provisional) US 2000561500 A 20000428 (Local application)

Original IPC: A61K-39/395(A) C07K-16/00(B) C12P-21/08(B)

Current IPC: A61K-39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/435(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/52(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/18(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-16/22(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/24(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-5/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-5/103(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

Original US Class (secondary): 424145.1 424133.1 424134.1 424135.1 424141.1 424142.1 424143.1 43569.1 435335 435810 530387.1 530387.3 530388.1 530388.15 530388.23 530391.1 530391.3 530391.5 530391.7 530809 530864 530865 530866

Original Abstract: Disclosed are antibodies that specifically inhibit VEGF binding to only one (VEGFR2) of the two VEGF receptors. The antibodies effectively inhibit angiogenesis and induce tumor regression, and yet have improved safety due to their specificity. The present invention thus provides new antibody-based compositions, methods and combined protocols for treating cancer and other angiogenic diseases. Advantageous immunoconjugate and prodrug compositions and methods using the new VEGF-specific antibodies are also provided.

Claim: 1.A composition comprising a biologically effective amount of a purified anti-VEGF antibody, or antigen-binding fragment thereof, that binds to the same epitope as the monoclonal antibody 2C3 produced by hybridoma A TCC PTA 1595 and that significantly inhibits VEGF binding to the VEGF receptor VEGFR2 (KDR/Flk-1) without significantly inhibiting VEGF binding to the VEGF receptor VEGFR1 (Flt-1).|US 6342221 B1 (Update 200210 E)

Publication Date: 20020129

**\*\*Antibody conjugate compositions for selectively inhibiting VEGF.\*\***

Assignee: Board of Regents, The University of Texas System, Austin, TX, US

Inventor: Thorpe, Philip E., Dallas, TX, US Brekken, Rolf A., Seattle, WA, US

Agent: Williams, Morgan and Amerson

Language: EN

Application: US 1999131432 P 19990428 (Related to Provisional) US 2000561108 A 20000428 (Local application)

Original IPC: A61K-39/44(A) A61K-39/395(B)

Current IPC: A61K-39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-

39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/435(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)

C07K-14/52(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/18(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)

C07K-16/22(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/24(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

C07K-5/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-5/103(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

Original US Class (secondary): 424178.1 424130.1 424179.1 424181.1 424183.1 424193.1

424195.11 4241.49 4241.53 4249.3 4249.34 4249.6 4357.21 43569.1 43570.21 435810 4357.23

4357.1 530391.1 530391.3 530391.5 530391.7 530391.9

Original Abstract: Disclosed are antibodies that specifically inhibit VEGF binding to only one (VEGFR2) of the two VEGF receptors. The antibodies effectively inhibit angiogenesis and induce tumor regression, and yet have improved safety due to their specificity. The present invention thus provides new antibody-based compositions, methods and combined protocols for treating cancer and other angiogenic diseases. Advantageous immunoconjugate and prodrug compositions and methods using the new VEGF-specific antibodies are also provided.

Claim: 1. A composition comprising at least a first immunoconjugate comprising at least a first anti-VEGF antibody, or antigen-binding fragment thereof, that binds to substantially the same epitope as the monoclonal antibody 2C3 produced by hybridoma ATCC PTA 1595 operatively attached to at least a first biological agent. [US 6416758 B1 (Update 200253 E)]

Publication Date: 20020709

**\*\*Antibody conjugate kits for selectively inhibiting VEGF.\*\***

Assignee: Board of Regents, The University of Texas System, Austin, TX, US

Inventor: Thorpe, Philip E., Dallas, TX, US Brekken, Rolf A., Seattle, WA, US

Agent: Williams, Morgan and Amerson

Language: EN

Application: US 1999131432 P 19990428 (Related to Provisional) US 2000561526 A 20000428 (Local application)

Original IPC: A61K-38/36(A) C07K-16/22(B) C12P-21/08(B)

Current IPC: A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-

47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/435(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)

C07K-14/52(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/18(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)

C07K-16/22(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/24(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

C07K-5/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-5/103(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

Original US Class (secondary): 424145.1 4241.49 4241.53 4241.69 4249.2 4249.3 424133.1

424134.1 424135.1 424141.1 424142.1 424145.1 424178.1 424179.1 424181.1 424183.1

424195.11 4357.23 43569.1 43569.6 43569.7 43570.21 435810 530387.3 530388.1 530388.15

530388.24 530391.3 530391.7 530391.9



Original Abstract : Disclosed are antibodies that specifically inhibit VEGF binding to only one (VEGFR2) of the two VEGF receptors. The antibodies effectively inhibit angiogenesis and induce tumor regression, and yet have improved safety due to their specificity. The present invention thus provides new antibody-based compositions, methods and combined protocols for treating cancer and other angiogenic diseases. Advantageous immunoconjugate and prodrug compositions.

Claim: 1. A kit comprising, in at least a first composition: \* (a) at least a first immunoconjugate comprising at least a first biological agent operatively attached to at least a first anti-VEGF antibody, or antigen-binding fragment thereof, wherein said anti-VEGF antibody, or antigen-binding fragment thereof, effectively competes with the monoclonal antibody 2C3, produced by hybridoma ATCC PTA 1595, for binding to VEGF; and \* (b) at least a second biological agent. |US 6524583 B1 (Update 200323 E)

Publication Date: 20030225

\*\*Antibody methods for selectively inhibiting VEGF\*\*

Assignee: Board of Regents, The University of Texas System, Austin, TX, US

Inventor: Thorpe, Philip E., Dallas, TX, US Brekken, Rolf A., Seattle, WA, US

Agent: Williams, Morgan and Amerson, US

Language: EN

Application: US 1999131432 P 19990428 (Related to Provisional) US 2000561499 A 20000428 (Local application)

Original IPC: A61K-39/395(A) C07K-16/00(B) C12P-21/08(B)

Current IPC: A61K-39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-

39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/435(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)

C07K-14/52(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/18(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)

C07K-16/22(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/24(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

C07K-5/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-5/103(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

Original US Class (secondary): 424145.1 42413 3.1 424135.1 424141.1 530387.1 530388.1 530388.15 530388.25 530809 53 0864 530865 530866

Original Abstract: Disclosed are antibodies that specifically inhibit VEGF binding to only one (VEGFR2) of the two VEGF receptors. The antibodies effectively inhibit angiogenesis and induce tumor regression, and yet have improved safety due to their specificity. The present invention thus provides new antibody-based compositions, methods and combined protocols for treating cancer and other angiogenic diseases. Advantageous immunoconjugate and prodrug compositions and methods using the new VEGF-specific antibodies are also provided.

Claim: What is claimed is: 1.1. A method of inhibiting VEGF binding to the VEGF receptor VEGFR2, without significantly inhibiting VEGF binding to the VEGF receptor VEGFR1, the method comprising contacting a cell population including cells that express VEGFR2 (KDR/Flk-1) and cells that express VEGFR1 (Flt-1) with a composition comprising a biologically effective amount of at least a first anti-VEGF antibody that binds to substantially the same epitope as the monoclonal antibody 2C3 produced by hybridoma ATCC PTA 1595, or an antigen-binding fragment of said antibody. 2.4. A method of inhibiting angiogenesis, comprising contacting a population of potentially angiogenic blood vessels with at least a first anti-angiogenic composition comprising a biologically effective amount of at least a first anti-VEGF antibody, or antigen-binding fragment thereof, that binds to substantially the same epitope as the

monoclonal antibody 2C3 produced by hybridoma ATCC PTA 1595. |US 6676941 B2 (Update 200405 E)

Publication Date: 20040113

**\*\*Antibody conjugate formulations for selectively inhibiting VEGF\*\***

Assignee: Board of Regents, The University of Texas System, Austin, TX, US

Inventor: Thorpe, Philip E., Dallas, TX, US Brekken, Rolf A., Seattle, WA, US

Agent: Williams, Morgan and Amerson, US

Language: EN

Application: US 1999131432 P 19990428 (Related to Provisional) US 2000561108 A 20000428 (Continuation of application) US 2001998831 A 20011130 (Local application)

Related Publication: US 6342 221 A (Continuation of patent)

Original IPC: A61K-39/44(A) A61K-39/395 (B)

Current IPC: A61K-39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-

39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/435(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)

C07K-14/52(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/18(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)

C07K-16/22(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/24(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

C07K-5/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-5/103(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

Original US Class (secondary): 424178.1 424130.1 424179.1 424181.1 424183.1 424193.1

424195.11 4241.49 4241.53 4249.3 4249.34 4249.6 4247.21 4357.1 4357.2 4357.3 435810

530391.1 530391.3 530391.5 530391.7 530391.9

Original Abstract: Disclosed are antibodies that specifically inhibit VEGF binding to only one (VEGFR2) of the two VEGF receptors. The antibodies effectively inhibit angiogenesis and induce tumor regression, and yet have improved safety due to their specificity. The present invention thus provides new antibody-based compositions, methods and combined protocols for treating cancer and other angiogenic diseases. Advantageous immunoconjugate and prodrug compositions and methods using the new VEGF-specific antibodies are also provided.

Claim: What is claimed is: 1.1. A pharmaceutically acceptable composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and at least a first immunoconjugate; wherein said immunoconjugate comprises at least a first anti-VEGF antibody, or an antigen-binding fragment thereof, that binds to substantially the same epitope as the monoclonal antibody 2C3, produced by hybridoma ATCC PTA 1595, operatively attached to at least a first biological agent; and wherein said pharmaceutically acceptable carrier is an ophthalmic formulation or a liposomal formulation. |US 6703020 B1 (Update 200418 E)

Publication Date: 20040309

**\*\*Antibody conjugate methods for selectively inhibiting VEGF\*\***

Assignee: Board of Regents, The University of Texas System, Austin, TX, US

Inventor: Thorpe, Philip E., Dallas, TX, US Brekken, Rolf A., Seattle, WA, US

Agent: Williams, Morgan and Amerson, US

Language: EN

Application: US 1999131432 P 19990428 (Related to Provisional) US 2000561005 A 20000428 (Local application)

Original IPC: A61K-39/395(A) A61K-39/44(B) C07K-16/00(B) C12P-21/08(B)

Current IPC: A61K-39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-

39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,2005 1008,C) C07K-14/435(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)  
C07K-14/52(R,I,M,EP,2 0060101,20051008,A) C07K-16/18(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)  
C07K-16/22 (R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-5/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)  
C07K-5/103(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

Original US Class (secondary): 424178.1 424130.1 424145.1 424156.1 424158.1 530387.1  
530388.2

Original Abstract: Disclosed are antibodies that specifically inhibit VEGF binding to only one (VEGFR2) of the two VEGF receptors. The antibodies effectively inhibit angiogenesis and induce tumor regression, and yet have improved safety due to their specificity. The present invention thus provides new antibody-based compositions, methods and combined protocols for treating cancer and other angiogenic diseases. Advantageous immunoconjugate and prodrug compositions.

Claim: What is claimed is: 1.1. A method of specifically delivering a therapeutic agent to a VEGFR1- expressing cell, comprising: \* (a) providing an immunoconjugate comprising said therapeutic agent operatively attached to at least a first anti-VEGF antibody, or antigen -binding fragment thereof, that binds to substantially the same epitope as the monoclonal antibody 2C3 (ATCC PTA 1595); and \* (b) exposing said immunoconjugate to a cell population that comprises VEGFR1-expressing cells that have VEGF bound thereto, thereby delivering said therapeutic agent to said VEGFR1-expressing cells.[US 6887 468 B1 (Update 200530 E)]

Publication Date: 20050503

**\*\*Antibody kits for selectively inhibiting VEGF\*\***

Assignee: Board of Regents, The University of Texas System, Austin, TX, US Thorpe, Philip E., Dallas, TX, US Residence: US Brekken, Rolf A., Seattle, WA, US Residence: US  
Inventor: Thorpe, Philip E., Dallas, TX, US Residence: US Brekken, Rolf A., Seattle, WA, US Residence: US

Agent: Williams, Morgan and Amerson

Language: EN

Application: US 1999131432 P 19990428 (Related to Provisional) US 2000562245 A 20000428 (Local application)

Original IPC: A61K-39/395(A) C07K-16/00(B)

Current IPC: C07K-16/18(R,I,M,EP,20060101, 20051008,C) C07K-16/22(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

Original US Class (secondary): 424130.1 424139.1 424143.1 424145.1 530388.1

Original Abstract: Disclosed are antibodies that specifically inhibit VEGF binding to only one (VEGFR2) of the two VEGF receptors. The antibodies effectively inhibit angiogenesis and induce tumor regression, and yet have improved safety due to their specificity. The present invention thus provides new antibody-based compositions, methods and combined protocols for treating cancer and other angiogenic diseases. Advantageous immunoconjugate and prodrug compositions and methods using the new VEGF-specific antibodies are also provided.

Claim: 1.1. A kit comprising, in at least a first composition, at least a first purified anti-VEGF antibody, or antigen-binding fragment thereof, that effectively competes with the monoclonal antibody 2C3, produced by hybridoma ATCC PTA 1595, for binding to VEGF; and at least a second biological agent.[US 7056509 B2 (Update 200638 E)]

Publication Date: 20060606

**\*\*Antibody methods for selectively inhibiting VEGF\*\***

Assignee: Board of Regents The University of Texas System, Austin, TX, US Thorpe, Philip E., Dallas, TX, US Residence: US Brekken, Rolf A., Seattle, WA, US Residence: US  
Inventor: Thorpe, Philip E., Dallas, TX, US Residence: US Brekken, Rolf A., Seattle, WA, US Residence: US

Agent: Fussey, Shelley P. M.

Language: EN

Application: US 1999131432 P 19990428 (Related to Provisional) US 2000561499 A 20000428 (Continuation of application) US 20033 73561 A 20030224 (Local application)

Related Publication: US 6524583 A (Continuation of patent)

Original IPC: A61K-39/395(B,I,H,US,20060101,2 0060606,A,F) C07K-16/00(B,I,H,US,20060101,20060606,A,L) C12P-21/08(B,I,H,US,20060101,20060606,A,L)

Current IPC: A61K-39/395(B,I,H,US,20060101, 20060606,A,F) C07K-16/00(B,I,H,US,20060101,20060606,A,L) C12P-21/08(B,I,H,US,20060101,20060606,A,L)

Original US Class (secondary): 424145.1 424130.1 424133.1 424184.1 530387.1 530388.1 530388.15 530388.25 530809 530864 530865 530866

Original Abstract: Disclosed are antibodies that specifically inhibit VEGF binding to only one (VEGFR2) of the two VEGF receptors. The antibodies effectively inhibit angiogenesis and induce tumor regression, and yet have improved safety due to their specificity. The present invention thus provides new antibody-based compositions, methods and combined protocols for treating cancer and other angiogenic diseases. Advantageous immunoconjugate and prodrug compositions and methods using the new VEGF-specific antibodies are also provided.

Claim: What is claimed is: 1.1. A method of neutralizing the survival signal of VEGF, the method comprising contacting a cell population including cells that express VEGFR 2 (KDR/Flk-1) with a composition comprising a biologically effective amount of at least a first anti-VEGF antibody that binds to substantially the same epitope as the monoclonal antibody 2C3 produced by hybridoma ATCC PTA 1595, or an antigen-binding fragment of said antibody; where in said anti-VEGF antibody neutralizes the survival signal of VEGF, which is mediated through VEGFR2.

## WIPO

Publication Number: WO 2000064946 A2 (Update 200067 B)

Publication Date: 20001102

**\*\*COMPOSITIONS AND METHODS FOR CANCER TREATMENT BY SELECTIVELY INHIBITING VEGF COMPOSITIONS ET PROCÉDES DE TRAITEMENT DU CANCER PAR INHIBITION SELECTIVE DE VEGF\*\***

Assignee: BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM, 201 West 7th Street, Austin, TX 78701, US Residence: US Nationality: US (TEXA)

Inventor: THORPE, Philip, E., 6722 Lakewood Boulevard, Dallas, TX 75214, US BREKKEN, Rolf, A., 14304 25th Avenue NE, Seattle, WA 98125, US

Agent: FUSSEY, Shelley, P., M., Williams, Morgan Amerson, P.C., Suite 250, 7676 Hillmont, Houston, TX 77040, US

Language: EN (93 pages, 4 drawings)

Application: WO 2000US11367 A 20000428 (Local application)

Priority: US 1999131432 P 19990428

Designated States: (National Original) AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH

CN CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG  
KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU  
SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG UZ VN YU ZA ZW (Regional Original) AT BE  
CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW NL OA PT SD SE SL  
SZ TZ UG ZW

Original IPC: C07K-16/00(A)

Current IPC: A61K-39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-  
39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-  
47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/435(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-  
14/52(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/18(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-  
16/22(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-5/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-  
5/103(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

Original Abstract: Disclosed are antibodies that specifically inhibit VEGF binding to only one (VEGFR2) of the two VEGF receptors. The antibodies effectively inhibit angiogenesis and induce tumor regression, and yet have improved safety due to their specificity. The present invention thus provides new antibody-based compositions, methods and combined protocols for treating cancer and other angiogenic diseases. Advantageous immunoconjugate and prodrug compositions and methods using the new VEGF-specific antibodies are also provided.

L'invention concerne des anticorps qui inhibent specifiquement le VEGF se liant a un seul (VEGFR2) des deux recepteurs VEGF. Les anticorps inhibent efficacement l'angiogenese et induisent aussi efficacement une regression de tumeur, tout en presentant une securite accrue du fait de leur specificite. L'invention concerne par consequent de nouvelles compositions a base d'anticorps, ainsi que des procedes et des protocoles combines pour traiter le cancer et d'autres maladies angiogeniques. Elle concerne egalement des compositions d'immunoconjugues et de promedicaments ainsi que des procedes interessants faisant appel aux nouveaux anticorps pour le VEGF.

### **South Africa**

Publication Number: ZA 200108285 A (Update 200264 E)

Publication Date: 20020828

Assignee: UNIV TEXAS SYSTEM (TEXA)

Inventor: THORPE P E BREKKEN R A

Language: EN (329 pages)

Application: ZA 20018285 A 20011009 (Local application)

Priority: US 1999131432 P 19990428

Original IPC: C07K(A)

Current IPC: A61K-39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-  
39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-  
47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/435(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-  
14/52(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/18(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-  
16/22(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-5/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-  
5/103(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)|ZA 200108612 A (Update 200264 E)

Publication Date: 20020828

Assignee: UNIV TEXAS SYSTEM (TEXA)

Inventor: THORPE P E BREKKEN R A

Language: EN (339 pages)

Application: ZA 20018612 A 20011009 (Local application)

Priority: US 1999131432 P 19990428

Original IPC: C07K(A)

Current IPC: A61K-39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-

39/395(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) A61K-47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-

47/48(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-14/435(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-

14/52(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-16/18(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-

16/22(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) C07K-5/00(R,I,M,EP,20060101,20051008,C) C07K-

5/103(R,I,M,EP,20060101,20051008,A)

Derwent World Patents Index

© 2007 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 10371146

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号  
特表2002-543093  
(P2002-543093A)

(43) 公表日 平成14年12月17日 (2002. 12. 17)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>  
A 6 1 K 39/395

識別記号

F I  
A 6 1 K 39/395

テマコード\* (参考)

N 4 B 0 2 4  
L 4 B 0 6 4  
M 4 B 0 6 5  
P 4 C 0 7 6  
4 C 0 8 4

45/00

45/00

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 349 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-614295(P2000-614295)  
(86) (22) 出願日 平成12年4月28日 (2000. 4. 28)  
(85) 翻訳文提出日 平成13年10月26日 (2001. 10. 26)  
(86) 国際出願番号 PCT/US 00/11367  
(87) 国際公開番号 WO 00/64946  
(87) 国際公開日 平成12年11月2日 (2000. 11. 2)  
(31) 優先権主張番号 60/131, 432  
(32) 優先日 平成11年4月28日 (1999. 4. 28)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 ボード オブ リージェンツ, ザ ユニ  
バーシティ オブ テキサス システム  
BOARD OF REGENTS, TH  
E UNIVERSITY OF TEX  
AS SYSTEM  
アメリカ合衆国 78701 テキサス オー  
スティン ダブリュー. セブンス スト  
リート 201

(72) 発明者 ソープ, フィリップ イー.  
アメリカ合衆国 テキサス 75214, ダ  
ラス, レイクウッド プールバード  
6722

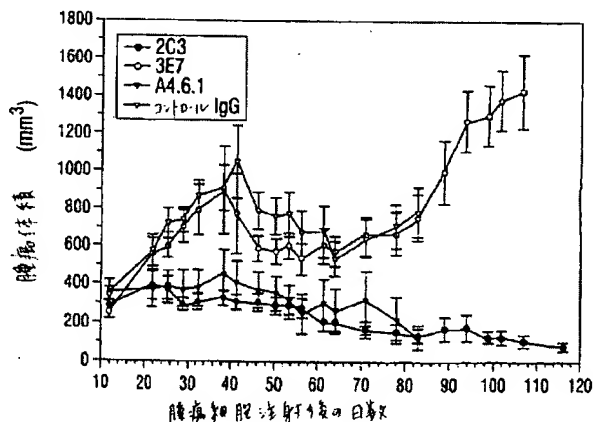
(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 VEGFの選択的阻害による癌処置のための組成物および方法

(57) 【要約】

2つのVEGFレセプターのうち1つ (VEGFR2) へのVEGFの結合のみを特異的に阻害する抗体が開示される。これらの抗体は、脈管形成を効率的に阻害し、そしてさらにその特異性に起因して改善された安全性を有する。従って、本発明は、癌および他の脈管形成障害を処置するための、新しい抗体ベースの組成物、方法および組合せたプロトコルを提供する。有利な免疫結合体およびプロドラッグ組成物ならびにこれらの新しいVEGF特異的抗体を使用する方法もまた、提供される。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 生物学的有効量の抗VEGF抗体、またはその抗原結合フラグメントを含む組成物であって、該抗体が、モノクローナル抗体ATCC PTA 1595と実質的に同じエピトープに結合し、かつVEGFレセプターVEGFR1 (Flt-1) へのVEGFの結合を有意に阻害することなく、VEGFレセプターVEGFR2 (KDR/Flk-1) へのVEGFの結合を有意に阻害する、組成物。

【請求項2】 前記抗体が、ヒト抗体、ヒト化抗体、部分的ヒト抗体、キメラ抗体もしくは組換え抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】 前記抗体が、ATCC PTA 1595として寄託されたハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体である、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】 前記抗体が、少なくとも第1の生物学的薬剤に作動可能に連結される、請求項1～3のいずれかに記載の組成物。

【請求項5】 前記抗体が、少なくとも第1の治療剤または実質的に不活性なプロドラッグを切断して実質的に活性な薬物を放出する薬剤に作動可能に連結される、請求項4に記載の組成物。

【請求項6】 前記抗体が、少なくとも第1の化学療法剤、放射療法剤、抗脈管形成剤、アポトーシス誘発剤、抗チューブリン薬、凝血薬、細胞傷害性薬剤、細胞増殖抑制剤または抗細胞性薬剤に作動可能に連結される、請求項5に記載の組成物。

【請求項7】 治療の際に使用するための、請求項1～6のいずれかに記載の組成物。

【請求項8】 眼性血管新生疾患、黄斑変性または血管新生化腫瘍を有する動物において新脈管形成を阻害する際に使用するための、請求項1～7のいずれかに記載の組成物。

【請求項9】 請求項1～8に記載の組成物の治療における使用。

【請求項10】 新脈管形成を阻害することによる、眼性血管新生疾患、黄



斑変性または癌の処置のための医薬の製造における、請求項1～8のいずれか1項に記載の組成物の使用。

【請求項11】 前記抗体が、モノクローナル抗体ATCC PTA 1595である、請求項1～8のいずれかに記載の組成物。

【請求項12】 前記抗体が、少なくとも第1の生物学的薬剤に作動可能に連結される、請求項1～8または11のいずれかに記載の組成物。

【請求項13】 前記抗体が、少なくとも、実質的に不活性なプロドラッグを切断して実質的に活性な薬物を放出する第1の薬剤に作動可能に連結される、請求項12に記載の組成物。

【請求項14】 前記抗体が、実質的に不活性なホスフェートプロドラッグを切断して実質的に活性な薬物を放出するアルカリホスファターゼに作動可能に連結される、請求項13に記載の組成物。

【請求項15】 前記抗体が、少なくとも第1の治療剤または診断剤に作動可能に連結される、請求項12に記載の組成物。

【請求項16】 前記抗体が、少なくとも第1の治療剤に作動可能に連結される、請求項15に記載の組成物。

【請求項17】 前記抗体が、少なくとも第1の治療剤および第2の治療剤に作動可能に連結される、請求項16に記載の組成物。

【請求項18】 前記抗体が、少なくとも第1の化学療法剤、放射療法剤、抗脈管形成剤、アポトーシス誘発剤、ステロイド、代謝拮抗薬、アントラサイクリン、ビンカアルカロイド、抗チューブリン薬、抗生物質、サイトカイン、アルキル化剤または凝血薬に作動可能に連結される、請求項16または17に記載の組成物。

【請求項19】 前記抗体が、内皮細胞を殺傷し得るか、または内皮細胞の増殖または細胞分裂を抑制し得る細胞傷害性薬剤、細胞増殖抑制剤または抗細胞性薬剤に作動可能に連結される、請求項18に記載の組成物。

【請求項20】 前記抗体が、植物由来、真菌由来、または細菌由来の毒素に作動可能に連結される、請求項19に記載の組成物。

【請求項21】 前記抗体が、A鎖毒素、リボソーム不活化タンパク質、 $\alpha$

ーサルシン、ゲロニン、アスペルギリン、レストリクトシン、リボヌクレアーゼ、エピポドフィロトキシン、ジフテリア毒素または *Pseudomonas* 体外毒素に作動可能に連結される、請求項20に記載の組成物。

【請求項22】 前記抗体が、リシンA鎖または脱グリコシル化リシンA鎖に作動可能に連結される、請求項21に記載の組成物。

【請求項23】 前記抗体が、抗脈管形成剤に作動可能に連結される、請求項18に記載の組成物。

【請求項24】 前記抗体が、アンギオポエチンに作動可能に連結される、請求項23に記載の組成物。

【請求項25】 前記抗体が、アンギオポエチン-2およびアンギオポエチン-1に作動可能に連結される、請求項24に記載の組成物。

【請求項26】 前記抗体が、アンギオスタチン、バスキュロスタチン、カンスタチン、またはマスピンに作動可能に連結される、請求項23に記載の組成物。

【請求項27】 前記抗体が、エンドスタチンに作動可能に連結される、請求項23に記載の組成物。

【請求項28】 前記抗体が、抗チューブリン薬に作動可能に連結される、請求項18に記載の組成物。

【請求項29】 前記抗体が、コルヒチン、タキソール、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシンおよびコンブレタスタチンからなる群から選択される、抗チューブリン薬に作動可能に連結される、請求項28に記載の組成物。

【請求項30】 前記抗体が、凝血薬に作動可能に連結される、請求項18に記載の組成物。

【請求項31】 請求項30に記載の組成物であって、ここで前記抗体が、第ⅠⅠ／ⅠⅠa因子、第ⅤⅠⅠ／ⅤⅠⅠa因子、第ⅠⅩ／ⅠⅩa因子、第Ⅹ／Ⅹa因子、GⅠa修飾を欠くビタミンK依存凝血因子、ラッセルクサリヘビ蛇毒第Ⅹ因子活性化剤、トロンボキサンA<sub>2</sub>、トロンボキサンA<sub>2</sub>シンターゼおよびα<sub>2</sub>-抗プラスミンからなる群から選択される凝血薬に作動可能に連結される、組成物。

【請求項32】 前記抗体が、組織因子、ヒト組織因子、第V I I因子を活性化する能力に欠ける変異組織因子、切断組織因子または二量体組織因子、三量体組織因子、もしくはポリマー組織因子、または組織因子誘導体に作動可能に連結される、請求項30に記載の組成物。

【請求項33】 前記抗体が、切断組織因子に作動可能に連結される、請求項32に記載の組成物。

【請求項34】 前記抗体が、診断薬、画像化剤または検出可能な薬剤に作動可能に連結される、請求項15に記載の組成物。

【請求項35】 前記抗体が、X線で検出可能な化合物、放射性イオンまたは核磁気スピン共鳴同位体に作動可能に連結される、請求項34に記載の組成物。

【請求項36】 前記抗体が、ビオチン、アビジン、または色素生産性物質と接触する際に着色産物を生成する酵素に作動可能に連結される、請求項34に記載の組成物。

【請求項37】 請求項12～33のいずれか1項に記載の組成物であって、ここで前記抗体が、融合タンパク質として前記生物学的薬剤に作動可能に連結され、該融合タンパク質は、組換えベクターを発現させることにより調製され、該組換えベクターは、同じリーディングフレームで、該生物学的薬剤をコードするDNAセグメントに作動可能に連結される該抗体をコードするDNAセグメントを含む、組成物。

【請求項38】 前記抗体が、生物学的に解離可能な結合または選択的に切断可能なリンカーを介して前記生物学的薬剤に作動可能に連結される、請求項12～33のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項39】 請求項38に記載の組成物であって、前記抗体が、ペプチドリンカーを介して前記生物学的薬剤に作動可能に連結され、該ペプチドリンカーが、ウロキナーゼ、プロウロキナーゼ、プラスミン、プラスミノゲン、TGF $\beta$ 、スタフィロキナーゼ、トロンビン、第I X a因子、第X a因子、メタロプロテイナーゼ、間質コラゲナーゼ、ゲラチナーゼまたはストロメライシンに対する切断部位を含む、組成物。

【請求項40】 前記抗体が、前記生物学的薬剤に、直接連結される、請求項12～36のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項41】 前記抗体が、前記治療剤または診断剤に結合する第2の抗体またはその抗原結合領域に作動可能に連結される、請求項15～36のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項42】 前記組成物が、薬学的に受容可能な組成物である、請求項1～8または11～41のいずれかに記載の組成物。

【請求項43】 前記薬学的に受容可能な組成物が、非経口投与のために処方される、請求項42に記載の組成物。

【請求項44】 前記組成物が、第2の治療剤をさらに含む、請求項1～8または11～43のいずれかに記載の組成物。

【請求項45】 前記第2の治療剤が、第2の抗癌剤である、請求項44に記載の組成物。

【請求項46】 前記第2の抗癌剤が、化学療法剤、放射療法剤、抗脈管形成剤、アポトーシス誘発剤、抗チューブリン薬または腫瘍を標的とした化学療法剤、放射療法剤、抗脈管形成剤、アポトーシス誘発剤もしくは抗チューブリン薬である、請求項45に記載の組成物。

【請求項47】 前記第2の抗癌剤が、アンギオポエチンまたは腫瘍を標的とするアンギオポエチンである、請求項46に記載の組成物。

【請求項48】 前記第2の抗癌剤が、腫瘍を標的とするアンギオポエチン-1である、請求項47に記載の組成物。

【請求項49】 前記第2の抗癌剤が、エンドスタチンまたは腫瘍を標的とするエンドスタチンである、請求項46に記載の組成物。

【請求項50】 前記第2の抗癌剤が、抗チューブリン薬または腫瘍を標的とする抗チューブリン薬である、請求項46に記載の組成物。

【請求項51】 請求項46に記載の組成物であって、ここで前記第2の抗癌剤が、第2の抗体またはその抗原結合フラグメントに作動可能に連結される治療剤を含む抗体治療剤構築物であって、該構築物が、腫瘍細胞、腫瘍脈管構造または腫瘍支質の、表面発現成分、表面アクセス可能成分または表面局在化成分に

結合する、組成物。

【請求項52】 治療の際に使用するための、請求項1～8または11～51のいずれかに記載の組成物。

【請求項53】 診断の際に使用するための、請求項1～8、11または34～36のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項54】 動物へ投与して新脈管形成を阻害する際に使用するための、請求項1～8、11または請求項23～29のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項55】 動物に投与して新脈管形成を阻害する際に使用するための、請求項54に記載の組成物であって、該動物は、眼性血管新生疾患または黄斑変性を有する、組成物。

【請求項56】 血管新生化腫瘍を有する動物に投与して、該血管新生化腫瘍に生物学的薬剤を送達する際に使用するための、請求項12～41のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項57】 癌を処置する際に使用するための、請求項1～8または11～56に記載の組成物。

【請求項58】 治療における請求項1～8または請求項11～57に記載の組成物の使用。

【請求項59】 新脈管形成を阻害することにより疾患を処置するための医薬の製造における、請求項1～8、11または請求項23～29のいずれか1項に記載の組成物の使用。

【請求項60】 前記医薬が、新脈管形成を阻害することにより、眼性血管新生疾患または黄斑変性を処置することを意図される、請求項59に記載の使用。

【請求項61】 生物学的薬剤を血管新生化腫瘍に送達することにより癌を処置するための医薬の製造における、請求項12～41のいずれか1項に記載の組成物の使用。

【請求項62】 癌を処置するための医薬の製造における、請求項1～8または11～57のいずれか1項に記載の組成物の使用。

【請求項63】 マクロファージ、破骨細胞または軟骨吸収細胞を実質的に

阻害することなく新脈管形成を阻害する際の使用のための組成物であって、該組成物は、生物学的有効量の抗VEGF抗体、またはその抗原結合フラグメントを含み、該抗体が、モノクローナル抗体2C3（ATCC PTA 1595）と実質的に同じエピトープに結合する、組成物。

【請求項64】 VEGFレセプターVEGFR1（Flt-1）へのVEGFの結合を有意に阻害することなく、VEGFレセプターVEGFR2（KDR／Flk-1）へのVEGFの結合を阻害することにより癌を処置するための医薬の製造における組成物の使用であって、該組成物が、生物学的有効量の抗VEGF抗体、またはその抗原結合フラグメントを含み、該抗体が、モノクローナル抗体2C3（ATCC PTA 1595）と実質的に同じエピトープに結合する、使用。

【請求項65】 請求項1～8または11～57のいずれか1項に記載の少なくとも第1の組成物を含むキット。

【請求項66】 請求項13または14に記載の少なくとも第1の組成物および実質的に不活性なプロドラッグを含む少なくとも第2の組成物を含むキットであって、該プロドラッグが、該第1の組成物中の前記抗体に連結される前記生物学的薬剤により切断されて実質的に活性な薬物を放出する、キット。

【請求項67】 請求項14に記載の少なくとも第1の組成物およびリン酸コンブレタスタチンを含む少なくとも第2の組成物を含むキット。

【請求項68】 抗VEGFモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマであって、該抗体は、モノクローナル抗体ATCC PTA 1595と実質的に同じエピトープに結合し、かつVEGFレセプターVEGFR1（Flt-1）へのVEGFの結合を有意に阻害することなく、VEGFレセプターVEGFR2（KDR／Flk-1）へのVEGFの結合を有意に阻害する、ハイブリドーマ。

【請求項69】 モノクローナル抗体ATCC PTA 1595。

【請求項70】 モノクローナル抗体ATCC PTA 1595と実質的に同じエピトープに結合する抗VEGF抗体を調製するための方法であって、非ヒト動物を、少なくとも第1の免疫原性VEGF成分を含む免疫組成物を用いて

免疫する工程、および該免疫された動物から該モノクローナル抗体A T C C P T A 1 5 9 5と実質的に交差反応する抗体を選択する工程を包含する、方法。

【請求項71】 前記非ヒト動物が、ヒト抗体ライブラリーを含むトランスジェニックマウスである、請求項70に記載の方法。

【請求項72】 前記抗V E G F抗体をコードする核酸を得る工程、および該核酸を発現させて組換え抗V E G F抗体を得る工程を包含する、請求項70または71に記載の方法。

【請求項73】 請求項70～72のいずれか1項に記載の方法であって、以下：

(a) 非ヒト動物に、少なくとも第1の免疫原性V E G F成分を含む免疫有効量の組成物を投与する工程；

(b) 前記免疫された動物の脾臓から単離されたR N Aを発現するコンビナトリアル免疫グロブリンファージミドライブラリーを調製する工程；

(c) モノクローナル抗体2 C 3 (A T C C P T A 1 5 9 5)と実質的に交差反応する抗V E G F抗体を発現するクローンを該ファージミドライブラリーから選択する工程；ならびに

(d) 該選択されたクローン由来の、抗V E G F抗体をコードする核酸を発現させて、組換え抗V E G F抗体を産生する工程、を包含する方法。

【請求項74】 V E G Fを検出する方法であって、V E G F／抗体複体の形成を可能にするために有効な条件下で、V E G Fを含有すると推測される組成物を、請求項1～8または11～57のいずれか1項に記載の組成物と接触させる工程、およびこのようにして形成された該複体を検出する工程、を包含する方法。

【請求項75】 V E G FレセプターV E G F R 1へのV E G Fの結合を有意に阻害することなく、V E G FレセプターV E G F R 2へのV E G Fの結合を阻害する方法であって、V E G F R 2 (K D R / F l k - 1) およびV E G F R 1 (F l t - 1)を発現する細胞の同種集団または異種集団を生物学的有効量の請求項1～8または11～57に記載の組成物と接触させる工程を包含する方法

。

【請求項76】 VEGF誘導内皮細胞増殖を特異的に阻害する方法であって、内皮細胞集団を生物学的有効量の請求項1～8または11～57のいずれか1項に記載の組成物と接触させる工程を包含する、方法。

【請求項77】 VEGF誘導マクロファージ機能、破骨細胞機能または軟骨吸収細胞機能を有意に阻害することなく、VEGF誘導内皮細胞増殖を阻害する方法であって、内皮細胞ならびにマクロファージ、破骨細胞および軟骨吸収細胞のうちの少なくとも1つを含む組織を、生物学的有効量の請求項1～8または11～57のいずれか1項に記載の組成物と接触させる工程を包含する方法。

【請求項78】 新脈管形成を阻害する方法であって、血管の集団を抗脈管形成組成物と接触させる工程を包含し、該新脈管形成組成物が、生物学的有効量の請求項1～8または11～57のいずれか1項に記載の組成物を含む、方法。

【請求項79】 新脈管形成疾患を処置する方法であって、新脈管形成疾患を有する動物に、少なくとも第1の薬学的組成物を投与する工程を包含し、該第1の薬学的組成物が、治療的有效量の請求項1～8または11～57のいずれか1項に記載の組成物を含む、方法。

【請求項80】 前記動物が、眼性血管新生疾患または黄斑変性を有する、請求項79に記載の方法。

【請求項81】 診断剤または治療剤を血管新生化腫瘍に送達するための方法であって、血管新生化腫瘍を有する動物に、生物学的有効量の請求項12～41のいずれか1項に記載の組成物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項82】 癌を処置するための方法であって、少なくとも第1の薬学的組成物を、血管新生化固形腫瘍、転移性腫瘍または原発性腫瘍からの転移を有するかまたは発生する危険性のある動物に投与する工程を包含し、ここで該少なくとも第1の薬学的組成物が、治療的有效量の請求項1～8または11～57のいずれか1項に記載の組成物を含む、方法。

【請求項83】 前記動物を放射療法に供する工程をさらに包含する、請求項81または82に記載の方法。

【請求項84】 癌を処置するための方法であって、以下：



(a) 請求項13または14に記載の第1の組成物を、血管新生化固形腫瘍、転移性腫瘍または原発性腫瘍からの転移を有する動物に投与し、それにより該組成物の前記抗体を腫瘍脈管構造または支質に局在化させる工程；および

(b) 引き続いて、該動物に、該第1の組成物中の抗体に連結される前記生物学的薬剤により切断される実質的に不活性なプロドラッグを含む第2の組成物を投与し、それにより実質的に活性な薬物を該腫瘍脈管構造または支質内に特異的に放出する工程、  
を包含する方法。

【請求項85】 前記動物がヒト患者である、請求項79～84のいずれか1項に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(発明の背景)**

本願は、同時係属中の米国仮出願番号60／131, 432（1999年4月28日出願）に対する優先権を主張し、本願の本文および図面の全体が、棄権することなく本明細書中で参考として特に援用される。米国政府は、国立保健研究所の譲渡番号1RO1 CA74951、5RO CA54168およびT32 GM07062に従って、本発明の権利を所有する。

**【0002】****(1. 発明の分野)**

本発明は一般に、抗体、脈管形成および腫瘍の処置の分野に関する。より詳細には、本発明は、2つのVEGFレセプターの一方（VEGFR2）のみに結合するVEGFを特異的に阻害する抗VEGF抗体を提供する。このような抗体は脈管形成を阻害し、そして腫瘍後退を誘導し、そしてさらにそれらの特異的具ロッキング特性に起因して改良された安全性を有する。本発明の抗体ベースの組成物および方法はまた、免疫結合体および他の治療的結合体、プロドラッグを含むその結合体を含有するキットおよび方法の使用に及ぶ。

**【0003】****(2. 関連技術の説明)**

化学治療剤に対する腫瘍細胞耐性は、臨床腫瘍学において有意な問題を示す。実際に、これは、この分野の特定の進歩にもかかわらず、ヒト癌のほとんどの流行形態の多くが、効果的な化学治療に未だ耐性である主な原因の1つである。

**【0004】**

別の腫瘍処置戦略は、「免疫毒素」の使用であり、ここで抗腫瘍細胞抗体は毒素を腫瘍細胞に送達するために使用される。しかし、化学治療アプローチと共通して、免疫毒素治療はまた、充実性腫瘍に適用した場合、重要な欠点を被る。例えば、抗原陰性または抗原欠損細胞は残存し、腫瘍を再増殖するか、またはさらなる転移を導き得る。

**【0005】**

抗体ベースの治療に対する充実性腫瘍の耐性に関するさらなる理由は、腫瘍塊が一般に、抗体および免疫毒素のような高分子薬剤に対して不浸透性であることである（Burrowsら、1992；Dvorakら、1991a；BaxterおよびJain、1991）。腫瘍内の物理的拡散距離および間質圧の両方は、このタイプの治療に対する有意な制限である。従って、充実性腫瘍（これは全てのヒト癌の90%より多くを占める）は、抗体および免疫毒性処置に対するさらに証明された耐性を有する。

#### 【0006】

さらに最近のストラテジーは、充実性腫瘍の脈管形成を標的にしている。腫瘍細胞自体よりむしろ、腫瘍の血管を標的にすることは、耐性腫瘍細胞の発達を導きそうになく、そして標的細胞が容易に受容可能であるという点において特定の利点を有する。さらに、多くの腫瘍細胞は、それらの酸素および栄養素に関して単一の血管に頼っているため、血管の破壊は、抗腫瘍効果の増幅を導く（BurrowsおよびThorpe、1994a；1994b）。代表的な血管標的ストラテジーは、米国特許第5,855,866号および同第5,965,132号に記載され、これらは特に、抗細胞性薬剤および毒素の腫瘍血管のマーカーへの標的送達を記載する。

#### 【0007】

血管標的アプローチの別の効果的なバージョンは、細胞血管内で発現または吸着されたマーカーに対して凝固因子を標的にすることである（Huangら、1997；米国特許第5,877,289、同第6,004,555号、および同第5,、号（米国出願番号08/482,369（1998年10月20日特許証発行料金支払））。毒素よりむしろ凝血薬を腫瘍血管に送達することは、減少した免疫原性のさらなる利点、および毒素の副作用のさらに低い危険性を有する。米国特許第5,877,289号に記載されるように、このような腫瘍特異的「凝血薬」における使用に好ましい凝固因子は、短縮形態のヒト凝固誘導タンパク質、組織因子（TF）、血液凝固の主なイニシエータである。

#### 【0008】

毒素および凝固因子の腫瘍血管への特異的送達は、腫瘍処置における有意な進

歩を示すが、特定の周辺腫瘍細胞はこのような治療によって生じる腫瘍内破壊がに勝り得る。従って、抗脈管形成戦略は、米国特許第5,855,866号および同第5,877,289号の腫瘍破壊方法との組み合わせた用途を有する。

#### 【0009】

抗脈管形成腫瘍処置戦略は、一般に充実性腫瘍の周辺における、出芽血管の増殖を阻害することに基づく。これらの治療は主に、微小転移巣の危険性を減らすため、またはより従来のインターベンション（例えば、手術または化学治療）の後、充実性腫瘍のさらなる増殖を阻害するために用いられる。

#### 【0010】

脈管形成は、既存の血管および／または循環内皮幹細胞からの新しい血管の発生である（Asaharaら、1997；Springerら、1998；FolkmanおよびShing、1992）。脈管形成は、多くの生理学的プロセス（例えば、胚形成、創傷治癒および月経）において重要な役割をはたす。脈管形成はまた、特定の病理学的現象において重要である。充実性腫瘍増殖および転移における役割に加えて、脈管形成成分を有する他の注目すべき状態は、関節炎、乾癬、および糖尿病網膜症である（HanahanおよびFolkman、1996；FidlerおよびEllis、1994）。

#### 【0011】

脈管形成は、正常組織および悪性組織において、脈管形成刺激薬、および標的組織および遠隔部位において産生される脈管形成インヒビターのバランスによって調節される（Fidlerら、1998；McNamaraら、1998）。血管内皮増殖因子-A（VEGF、血管浸透性因子、VPFとしても公知）は、脈管形成の一次刺激薬である。VEGFは、底酸素および腫瘍変異によって引き起こされ、そして様々な組織によって産生され得る多機能性サイトカインである（Kerbelら、1998；Mazureら、1996）。

#### 【0012】

病理状態における脈管形成の一次刺激薬としてのVEGFの認識は、VEGF活性をブロックする様々な試みに至った。阻害性抗VEGFレセプター抗体、可

溶性レセプター構築物、アンチセンスストラテジー、VEGFに対するRNAアプタマー、および低分子量VEGFレセプターチロシンキナーゼ(RTK)インヒビターは、全て、VEGFシグナル伝達を妨害する際の使用が提案されている(Siemeisterら、1998)。実際に、VEGFに対するモノクローナル抗体は、ヒト腫瘍異種移植増殖およびマウスにおける腹水形成を阻害することが示されている(Kimら、1993; Asanoら、1998; Mesianoら、1998; Luoら、1998a; 1998b; Borgstromら、1996; 1998)。

### 【0013】

上記の研究は、充実性腫瘍増殖におけるVEGFの重要性、および腫瘍治療のための標的としてのその可能性を強調しているが、VEGF誘導脈管形成を阻害するさらなる薬剤の同定は、治療的選択肢の数を拡大する際の利点となる。より特異的にVEGFレセプター結合を阻害する治療剤の開発は、それらの抗腫瘍効果が改良された特異性によって実質的に損なわれない限り、重要な進歩を示す。

### 【0014】

#### (発明の要旨)

本発明は、新規の治療組成物、ならびに抗脈管形成および抗腫瘍処置において使用するための方法を提供することによって、従来技術における特定の欠点を克服する。本発明は、2つの一次VEGFレセプターの一方(VEGFR2)のみに結合するVEGFを特異的に阻害する抗体に基づく。このような抗体は脈管形成を阻害し、そして他の抗VEGF抗体(すでに臨床試験されているものを含む)と同じぐらい効果的に腫瘍後退を誘導し、そしてさらに、それらの特異的遮断特性に起因する改良された安全性を有する。本発明の組成物および方法はまた、特定の部類の提供される抗体を使用する、免疫結合体および組み合わせ(プロドラッグを含む)の使用まで拡大する。

### 【0015】

本発明の特定の利点は、提供される抗体が、VEGFR1には結合せず、VEGFR2のみに結合するVEGFを阻害することである。これは、VEGFR2およびVEGFR1の両方に結合するVEGFを阻害する従来技術の主要抗体(

A 4. 6. 1を含む)と対照する。特にマクロファージ移動および化学走性、ならびに破骨細胞および軟骨吸収機能において、VEGFR1は脈管形成と無関係の重要な生物学的役割を有するため、VEGFR2媒介性脈管形成のみを阻害する現在の能力は別の利点である。マクロファージが宿主抗腫瘍応答をさらに媒介し得るという点において、および、例えば、小児癌の処置における、骨代謝が悪影響ではないという点において、これは注目すべき臨床的利点に変わる。

#### 【0016】

さらなる利点は、VEGFのVEGFR1への結合は本発明の抗体の存在において維持されるため、これらがVEGFR1に結合したVEGF（これは腫瘍内皮上でアップレギュレートされる）に結合することによって、腫瘍血管へ治療薬を特異的に送達するために使用される。従って、免疫結合体の状況において、本発明は、抗脈管形成特性および腫瘍破壊特性の両方を同じ分子内に有する薬剤を提供する。

#### 【0017】

VEGFR2により媒介される、VEGFの生存シグナルを中和するために提供される組成物の能力において、さらなる利点が存在する。従って、本発明の裸の結合した抗体は、他の治療薬および／または結合剤、特にそれらの破壊特性を妨げるVEGFの能力のため、インビボで最大の有効性を達成しない方法および薬剤との相乗的な組み合わせを形成する。

#### 【0018】

従って、本発明は、VEGFR2レセプターに結合するVEGFを特異的にブロックするか、または本質的にVEGFR2レセプターのみに結合するVEGFをブロックする抗体を提供する。このような抗体は、VEGFR1レセプター（Flt-1）に結合するVEGFを有意に阻害することなく、VEGFR2レセプター（KDR／Flk-1）に結合するVEGFを有意に阻害する。従って、これらの抗体は、VEGFR2レセプター（KDR／Flk-1）に結合するVEGFを阻害し、VEGFR1レセプター（Flt-1）に結合するVEGFを実質的に阻害せず、インビボで抗脈管形成効果および抗腫瘍効果を示し、そしてマクロファージ走化性、破骨細胞または軟骨吸収細胞の機能を有意に阻害しない

。

## 【0019】

従って、本発明の抗体は、簡単に「VEGFR2-遮断、非VEGFR1-遮断、抗VEGF抗体」と呼ばれる。さらにより簡単には、これらは「VEGFR2-遮断抗VEGF抗体」と呼ばれ、これは本発明の全ての組成物、用途および方法に関する簡潔さのために使用される。「VEGFR2-遮断抗VEGF抗体」は、VEGFR2レセプターに結合するVEGFをブロックするVEGFに対する抗体である。このような抗体はVEGFR2レセプター自体に対する抗体ではないことが明らかである。

## 【0020】

本発明以前に、VEGFR2レセプターに結合するVEGFを特異的にブロックする抗VEGF抗体を生成する動機付けはなく、そのような抗体のいずれの利点も想定されなかった。重要なことに、遮断抗体は増殖因子とそのレセプター（単数または複数）の相互作用を物理的に妨げる必要があり、そして増殖因子上のレセプター結合部位はサイズ制限されるため、このような特異的VEGFR2遮断抗VEGF抗体が開発され得るという示唆はなかった。

## 【0021】

しかし、本明細書中で開示される本発明者らの驚くべき発見の観点から、この分野はここで、このような特異的阻害抗VEGF抗体が調製され、そして異なる利点を有し得るという知識を提供する。本願はさらに、候補VEGFR2遮断抗VEGF抗体を生成するための方法論、および候補物のプールから実際のVEGFR2遮断特異的抗体を同定するために必要とされるアッセイの慣用技術の局面を記載する。従って、本発明の観点において、ある範囲のVEGFR2遮断抗VEGF抗体が、VEGFR1レセプターを経由するVEGFのシグナル伝達を阻害することなく、かつ顕著な欠点およびそれに関連する副作用のない、脈管形成の阻害、および脈管形成疾患および腫瘍の処置に関与する様々な実施形態において作製および使用され得る。

## 【0022】

本明細書全体にわたって使用される場合、用語「a」および「an」は、上限

がその後詳細に記載される場合を除いて、「少なくとも1つ」、「少なくとも第1の」、「1つ以上の」、または「複数の」参照成分または工程を意味する意図で使用される。従って、本明細書中で使用される場合、「抗体」とは、「少なくとも第1の抗体」を意味する。組み合わせの実施可能な制限およびパラメーターは、任意の単一の薬剤の量のように、本開示の観点において当業者に公知である。

### 【0023】

「VEGFレセプターVEGFR2 (KDR/F1k-1) に結合するVEGFを特異的に阻害する」抗体は、ここで、競合および／または機能性アッセイにより同定され得る。簡潔さのために好ましいアッセイは、ELISAに基づく競合アッセイである。競合アッセイにおいて、VEGFを可変量の試験抗体（例えば、100倍～1000倍過剰モル）と予備混合または混和し、試験抗体がVEGFR2に結合するVEGFを減少する能力を決定する。VEGFは、予め標識されそして直接検出され得るか、または（二次）抗VEGF抗体または二次および三次抗体検出システムを使用して検出され得る。このような競合アッセイのELISAフォーマットが好ましいフォーマットであるが、任意のタイプの免疫競合アッセイが実施され得る。

### 【0024】

全く関係のない抗体（非遮断抗VEGFモノクローナル抗体を含む）の存在下でVEGFR2に結合するVEGFは、このような競合アッセイにおけるコントロールの高値（100%）である。試験アッセイにおいて、試験抗体の存在下における、VEGFR2に結合するVEGFの有意な減少は、VEGFレセプターVEGFR2 (KDR/F1k-1) に結合するVEGFを有意に阻害する試験化合物を示す。

### 【0025】

有意な減少は、「再現可能な」、すなわち、一貫して観測される結合の減少である。本明細書の用語における、「有意な減少」は、VEGFに対する抗体の約100倍と約1000倍過剰モルとの間の任意の量において、少なくとも約45%、約50%、約55%、約60%、または約65%の（VEGFR2に結合す



るVEGFの)再現可能な減少として定義される。

#### 【0026】

本発明の好ましい特徴は、提供される抗体がVEGFR1に結合するVEGFを実質的に阻害しないことであるため、VEGFR2に結合するVEGFの中程度の有意な減少を示す抗体は、それらがVEGFR1に結合するVEGFを実質的に阻害しない限りは、なお有用である。それにもかかわらず、より好ましい抗体は、VEGFR2に結合するVEGFを阻害するより有意な能力を有する抗体である。これらの抗体は、VEGFに対する抗体の約100倍と1000倍過剰モルとの間の任意の量において、少なくとも70%、約75%、または約80%まで、VEGFR2に結合するVEGFを減少する再現可能な能力を示す抗体である。本発明を実施する必要はないが、少なくとも約85%、約90%、約95%またはさらに高くまでVEGFR2に結合するVEGFを減少する抗体は、決して除外されない。

#### 【0027】

抗VEGF抗体、またはそれらの抗原結合フラグメント（これらは、VEGFレセプターVEGFR1 (Flt-1) に結合するVEGFを有意に阻害することなく、VEGFレセプターVEGFR2 (KDR/f1K-1) に結合するVEGFを阻害する) は、VEGFR1を使用せず、上記のような単純な競合アッセイにより容易に確認される。

#### 【0028】

有意な減少の欠如は、「再現可能な」、すなわち、一貫して観測される「結合の実質的な維持」である。本明細書中の用語における「結合の実質的な維持」は、VEGFに対する抗体の約100倍と1000倍過剰モルとの間の任意の量において、少なくとも60%、約75%、約80%、または約85%の (VEGFR2に結合するVEGFにおける) 再現可能な維持として定義される。

#### 【0029】

VEGFR1に結合するVEGFを実質的に阻害しない抗体を使用する意図は、VEGFR1により媒介される生物学的機能を維持することである。従って、抗体は、生物学的応答がVEGFにより誘導されるのに十分な、VEGFR1に

結合するVEGFを維持することのみを必要とする。それでもなお、より好ましい抗体は、VEGFR1に結合するVEGFを維持するより有意な能力を有する抗体である。これらの抗体は、VEGFに対する抗体の約100倍と約1000倍過剰モルとの間の任意の量において、少なくとも88%、約90%、約92%、約95%、または約98~99%のレベルで、VEGFR1に結合するVEGFを維持する再現可能な能力を示す抗体である。

#### 【0030】

VEGFR2に結合するVEGFをより実質的に阻害する抗体は、VEGFR1の結合のさらなる減少を許容し得るようであることが理解される。同様に、抗体がVEGFR2に結合するVEGFの中程度の減少を有する場合、VEGFR1への結合の維持はより厳密に追求されるべきである。

#### 【0031】

抗体がVEGFレセプターVEGFR2（KDR／Flk-1）に結合するVEGFを阻害することを同定および／または確認するための別の好ましい結合アッセイは、同時沈降アッセイである。同時沈降アッセイは、溶液中の1つ以上のレセプターへのVEGFの結合をブロックする抗体の能力を試験する。このようなアッセイにおいて、VEGFまたは検出可能に標識されたVEGFは、適切な形態のレセプターと共にインキュベートされる。

#### 【0032】

免疫沈降アッセイまたは同時沈降アッセイを実施するための多くの様式がある。本発明の場合において、「適切な形態のレセプター」は、問題のVEGFR2レセプター、またはそのレセプターの細胞外ドメインであり得る。次いで免疫沈降は、標準試薬と同様に、VEGFR2レセプターに対する抗体、またはVEGFが結合する部位とは異なるレセプターの細胞外ドメインの存在を必要とする。本発明は、他の「適切な」形態のVEGFレセプター、すなわち、Fc抗体部分に結合したレセプターの細胞外ドメインを提供する。このようなレセプター／Fc構築物は、タンパク質Aベースの組成物のような有用な免疫沈降組成物と共にインキュベートすることによって沈降され得る。

#### 【0033】

適切なレセプターに関係なく、好ましくは、免疫沈降アッセイまたは同時沈降アッセイが、コントロールを用いて実施される。VEGFのみが選択したレセプターに結合する能力は、抗VEGF抗体の非存在下での沈降により確認されるべきである。好ましくは、並行インキュベーションが、コントロールとして作用する公知の結合特性を有する抗体の存在下または非存在下で行われる。最も好ましくは、遮断コントロールおよび非遮断コントロール抗体の両方を使用するアッセイが、並行して行われる。

#### 【0034】

次いで、任意の結合免疫学的種は、例えば、効果的な免疫沈降組成物（例えば、プロテインA組成物またはプロテインAセファロースビーズ）とのインキュベーションによって免疫沈降される。次いで、この沈降物は、VEGFの存在について試験される。最初のインキュベーションにおけるVEGFが、検出可能に標識されたVEGF（例えば、放射能標識したVEGF）であった場合、免疫沈降物におけるVEGFは、直接検出され得る。免疫沈降物における任意の未標識VEGFは、その他の適切な手段によって（例えば、ゲル分離および抗VEGF抗体での免疫検出によって）検出され得る。

#### 【0035】

抗体のVEGFレセプター（例えば、VEGFR2）に結合するVEGFを遮断する能力は、共沈殿アッセイのようなアッセイにおいて容易に定量化され得るが、定量的結果はまた有益である。定量化は、標識化VEGFの直接測定によって（すなわち、例えば、免疫検出されたVEGFのデンストメトリー分析によって）達成され得る。従って、再現可能な（すなわち、一貫して観察される）VEGFR2に結合するVEGFを阻害する能力を示す抗体は、検出され得、そして有用な抗体は、上記で概要された定量基準に従って選択され得る。

#### 【0036】

VEGFレセプターVEGFR1（Flt-1）に結合するVEGFを有意に阻害しない、抗VEGF抗体はまた、VEGFR2ではなくてVEGFR1を用いて上記のような共沈殿アッセイを行うことによって容易に同定され得る。従って、VEGFレセプターVEGFR1（Flt-1）に結合するVEGFを有意

に阻害しないが、VEGFレセプターVEGFR2（KDR／Flk-1）に結合するVEGFを阻害する、抗VEGF抗体はまた、このような方法を用いて容易に同定され得る。

#### 【0037】

本願はまた、VEGFレセプターVEGFR2（KDR／Flk-1）に結合するVEGFを有意に阻害する抗体を、同定および／または確認するために種々の機能的アッセイを提供する。これらは、一般的には、特定の規定された生物学的応答を担うレセプターとしてのVEGFR2の同定に関する。上記の競合型アッセイよりも好ましくないが、このアッセイは、無細胞系においておこなわれ、かつ最も再現性、确实性、省力性、および経済的であり、以下のアッセイは、それでもなお、本発明の文脈において有用である。

#### 【0038】

例えば、VEGFR2遮断抗VEGF抗体は、VEGF媒介性内皮細胞増殖を阻害する（VEGFのミトジェン活性を阻害する）能力について試験することによって同定され得る。任意の適切なアッセイは、試験抗体を有するかまたは有しないVEGFの存在下で種々の内皮細胞のいずれかを用いて使用され得る。好ましくは、2連アッセイは、平行して行われる（例えば、VEGFを有しないアッセイおよび規定された特徴（遮断および遮断しないの両方）のコントロール抗体を有するアッセイ）。内皮細胞増殖は決定され、そして好ましくは比色アッセイを含む、細胞数を決定する任意の容認可能な手段によって正確に定量される。

#### 【0039】

VEGF媒介性内皮細胞増殖を阻害する能力を有する抗体は、約25%、30%、35%、40%、45%または50%あるいはその程度のVEGF媒介性内皮細胞増殖の一貫して観察された阻害を一般的に示す。このような範囲における阻害は、インビボでの新脈管形成を阻害するのに十分な特徴を有する抗体を示す。より有意な阻害活性を有する抗体は、本発明から除外されない。

#### 【0040】

本発明に従って抗体を同定するためのさらなる機能的アッセイは、VEGF誘導性リン酸化のブロックを試験するためにアッセイされる。任意の適切なアッセ

イは、ネイティブかまたは組換えのリン酸化可能VEGFR2のいずれかの形態を発現する、種々の内皮細胞のいずれかを用いて使用され得る。細胞は、適切な時間で試験されるべき抗体の存在または非存在下でVEGFとインキュベートされる。好ましくは、2連アッセイは、平行して行われる（例えば、VEGFを有しないアッセイおよび規定される特徴（遮断および遮断しないの両方）のコントロール抗体を有するアッセイ）。

#### 【0041】

VEGFR2のVEGF誘導性リン酸化は、決定され、そして好ましくは任意の受容可能な手段によって正確に定量化される。一般的には、VEGFR2は、さらなる分析のために免疫沈降された。VEGFR2のリン酸化の程度は、直接決定され得る。例えば、この細胞は、<sup>32</sup>P標識ATPとともにインキュベートされ得、これは、免疫沈降したVEGFR2内の<sup>32</sup>Pの直接の定量化を可能にする。好ましくは、免疫沈降したVEGFR2は、その他の手段によって（例えば、ゲル分離およびリン酸化チロシン残基に結合する抗体との免疫検出によって）分析される。VEGFR2のVEGF誘導性リン酸化を阻害する能力を有する抗体は、一般的には、リン酸化されたVEGFR2のレベルにおいて一貫して観察される減少を示す。

#### 【0042】

本発明に従ってVEGFR2遮断抗VEGF抗体を同定するためのなおさらなる機能的アッセイは、VEGF誘導性脈管透過性の阻害を試験するためにアッセイされる。任意のこのようなアッセイが使用されるが、特定の適切なアッセイは、Miles透過性アッセイである。ここで動物（例えば、モルモット）は、色素（Evan青色素）とともに注射され、そしてこの動物の皮膚における色素の外観は、試験抗体の存在または非存在下でVEGFの供給後に決定される。好ましくは、2連研究は、平行して行われる（例えば、VEGFを有しない研究および規定された特徴（遮断および遮断しないの両方）のコントロール抗体を有する研究）。この動物の皮膚における色素の外観は、代表的にはこの動物の背面におけるスポット（例えば、青のスポット）であり、これは撮影および測定され得る。

## 【0043】

VEGFR2遮断抗VEGF抗体は、一貫して観察される低濃度（例えば、VEGFに対して100倍または1000倍のモル濃度過剰で提供される場合）での阻害としてVEGF誘導性脈管透過性を阻害する。VEGFR2に結合するVEGFを遮断しない抗体は、VEGF誘導性脈管透過性の任意の有意な阻害を示さない。一般的には、高濃度（例えば、VEGFに対して10倍のモル濃度）でのみVEGF誘導性透過性を遮断する抗体は、本発明に従う特徴を有する抗体ではない。

## 【0044】

新脈管形成因子、従って抗脈管形成因子の広範に受容可能な機能的アッセイは、新生血管形成の角膜のマイクロポケットアッセイおよびニワトリ漿尿膜のアッセイ（CAM）アッセイである。米国特許第5,712,291号は、角膜マイクロポケットアッセイおよびCAMアッセイが、新脈管形成の疾患の極めて広範の処置において使用する因子の同定を十分に予測することを示すことを参考として本明細書中で特に援用される。

## 【0045】

米国特許第5,001,116号はまた、CAMアッセイを記載する目的に関して本明細書中で参考として特に援用される。本質的には、受精したニワトリの胚は、3日目または4日目にそれらの殻から除去し、そして試験化合物を含むメチルセルロースディスクが、漿尿膜上に移植される。この胚は、約48時間後に試験され、そして鮮明な無血管域が、メチルセルロースディスクの周辺に現れる場合、この区域の直径が測定される。米国特許第5,712,291号に開示されるように、本発明の文脈においてこの目的に関して本明細書中で参考として特に援用され、任意の無血管域の外観は、抗脈管形成因子を証明するのに十分である。この大きな区域は、この抗体がより効果的である。

## 【0046】

新脈管形成の角膜マイクロポケットアッセイは、ラットまたはウサギの角膜を使用して実施され得る。このインビボモデルは、米国特許第5,712,291号および同第5,871,723号（各々は、証明の目的について本明細書中で

参考として特に援用される)によって証明されるように臨床学的な有用性の予測をするのに広範に受容される。本発明に特に関連することは考えられないが、これらは、それ自体が不活性であるが、活性な化合物を生じるように代謝される化合物を一般的に認識するので、この角膜アッセイは、CAMアッセイにおいて望ましい。

#### 【0047】

本発明において、この角膜マイクロポケットアッセイを使用して、抗脈管形成因子を同定する。これは、一貫して観察され、かつ好ましくは顕著であるこの角膜内の血管の数の減少によって示されるように脈管形成における有意な減少によって証明される。このような応答は、この試験基質と接触される場合、好ましくは維持される増殖の証明を示さない予備の新芽および／またはヘアピンループのみを示すこれらの角膜として定義される。

#### 【0048】

本発明の例示的なVEGFR2遮断抗体、抗VEGF抗体(および抗原結合フラグメント)としては、以下の抗体を含む:

- (a) VEGFレセプターVEGFR2(KDR/F1k-1)に結合するVEGFを有意に阻害する抗体;
- (b) VEGFレセプターVEGFR1(Flt-1)に結合するVEGFを有意に阻害しない抗体;
- (c) VEGFR2のVEGF誘導性リン酸化を阻害し、そして好ましくは有意に阻害する抗体;
- (d) VEGF誘導性脈管透過性を阻害し、そして好ましくは有意に阻害する抗体;
- (e) VEGF媒介性内皮細胞増殖を阻害し、そして好ましくは有意に阻害する抗体;
- (f) 脈管形成を阻害し、そして好ましくは有意に阻害する抗体;
- (g) マクロファージ、破骨細胞または軟骨吸収細胞のVEGFR1媒介性の刺激または活性化を有意に阻害しない抗体;および
- (h) 血管化腫瘍を有する動物への投与の際に腫瘍脈管構造および腫瘍支質に局

部集中する抗体。

#### 【0049】

本発明の特定の局面は、VEGFR2レセプターに結合するVEGFを特異的に阻害し、インビボで有意な抗腫瘍効果を有し、そしてVEGFR1レセプターに結合するVEGFを阻害しなかった抗体の本発明者の最初の驚くべき発見に基づいている。特定の実施形態において、本発明は、従って規定されたエピトープ特異性の抗体を提供し、ここでそのような抗体、またはその抗原結合フラグメントは、モノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と同一のエピトープに本質的に結合する。

#### 【0050】

特許請求の範囲に記載されている発明は、本明細書に従って可能にされ、そして技術的参考文献、ノウハウ、および出発物質を用意に利用可能にする。それにも関わらず、2C3モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株のサンプルは、2000年3月27日に提出され、アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)(アメリカ合衆国 バージニア20110-2209、マナサス、ユニバーシティー ブールバード10801)に寄託物として2000年3月28日に受理され、そしてATCC受託番号ATCC PTA 1595を2000年4月11日に付与された。この寄託物は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約およびその規定(ブタペスト条約)の下で作製された。この作製されたハイブリドーマは、関連する特許請求の範囲とともに米国特許の発行に基づいてブタペスト条約の条件の下でATCCによって入手可能である。この寄託されたハイブリドーマの利用可能性は、その政府の特許法に従って任意の政府の権力の下で付与された権利に違反して本発明を実施するためのライセンスと解釈するべきではない。

#### 【0051】

特定の好ましい組成物は、従って少なくとも第1の抗VEGF抗体、またはその抗原結合フラグメント、あるいは少なくとも第1の精製された抗VEGF抗体またはその抗原結合フラグメントを含む組成物(この抗原結合フラグメントは、実質的にモノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と同一のエ



ピトープに結合する) ; 少なくとも第1のモノクローナル抗体、またはその抗原結合フラグメントを含む組成物(この抗原結合フラグメントは、本質的にモノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と同一のエピトープでVEGFに結合する) ; および少なくとも第1の抗VEGFモノクローナル抗体、またはその抗原結合フラグメントを含む組成物(これらの抗原結合フラグメントは、モノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と同一のエピトープに結合する)である。

#### 【0052】

それにも関わらず、特定のその他の組成物、抗体、方法、ならびに特に本発明の第1医療用途および第2医療用途は、抗VEGF抗体、またはモノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)自体以外にモノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と同一、または実質的に同一であるエピトープに結合するその抗原結合フラグメントに関する。

#### 【0053】

用語モノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)「とおおよそ、実質的に、または本質的に同一、あるいは同一のエピトープに結合する」は、このモノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と「交差反応」する抗体を意味する。「交差反応抗体」は、VEGFに結合するためにモノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と効果的に競合し得るように、モノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と実質的に、または本質的に同一、あるいは同一のエピトープまたは「エピトープ部位」を認識する、それに結合する、またはそれに免疫特異性を有する抗体である。「2C3交差反応抗体」は、簡潔に「2C3様抗体」および「2C3ベース抗体」と呼ばれ、そしてこのような用語は、本明細書中で交互に使用され、そして組成物、使用および方法に適用される。

#### 【0054】

モノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)とおおよそ、実質的に、または本質的に同一、あるいは同一のエピトープに結合する1つ以上の抗体の同定は、その好都合な特徴を有する2C3が提供される以上は、現在簡単な

技術内容である。交差反応抗体の同定は、参照抗体と比較して決定されるので、この参照抗体（2C3）およびこの試験抗体の結合は、モノクローナル抗体2C3と同一または実質的に同一のエピトープに結合する抗体を同定するために決して必要でないエピトープを実際に決定することが、理解される。しかし、2C3によって結合されるこのエピトープに対する多数の情報は、本明細書中に含まれ、そしてエピトープマッピングは、Champeら（1995）（特に本明細書中で参考として援用される）によって記載のようにさらに実施され得る。

#### 【0055】

交差反応抗体の同定は、抗体の競合が評価され得る、種々の免疫学的スクリーニングアッセイのいずれか1つを使用して容易に決定され得る。全てのこのようなアッセイは、当該分野で慣用的であり、そして本明細書中でさらに詳細に記載される。1997年8月26日に刊行された米国特許第5,660,827号は、所定の抗体（例えば、2C3）と同一または実質的に同一のエピトープに結合する抗体を作製する方法に関与する本教示をなおさらに補足することを含む目的に関して特に本明細書中で参考として援用される。

#### 【0056】

例えば、試験されるべきこの試験抗体が、異なる供給源の動物から得られるか、または同等の異なるアイソタイプである場合、このコントロール（2C3）および試験抗体が、混合（または前吸着）される、サンプル競合アッセイが使用され得、そしてVEGF抗原組成物に適用される。「VEGF抗原組成物」によって、本明細書中に記載の2C3結合VEGF抗原を含む任意の組成物（例えば、VEGFはない）が意味される。従って、ELISAおよびウエスタンブロットに基づくプロトコルは、このような単純な競合研究における使用のために適切である。

#### 【0057】

特定の実施形態において、抗原組成物に適用する前の期間にこのコントロール抗体（2C3）とこの試験抗体の変化量（例えば、1:10または1:100）をプレ混合する。他の実施形態において、このコントロールおよび試験抗体の変化量は、抗原組成物に曝露の間に単に混合され得る。いずれにしても、種または

アイソタイプの2次抗体を使用することによって、結合したコントロール抗体のみを検出し得、コントロール抗体の結合は、実質的に同一のエピトープを認識する試験抗体の存在によって減少される。

#### 【0058】

コントロール抗体と任意の試験抗体（種またはアイソタイプに関係なく）との間の抗体競合研究を実施することにおいて、まず検出標識（例えば、その後の同定を可能にするビオチンまたは酵素標識（さらに放射能標識））を用いてコントロール（2C3）を標識し得る。これらの場合において、標識コントロール抗体を試験されるべき試験抗体と種々の比（例えば、1：10または1：100）でプレ混合またはインキュベートし、（必要に応じて適切な期間の後）次いで標識コントロール抗体の活性をアッセイし、そして潜在的に競合する試験抗体が、インキュベーション中に含まれなかったコントロール値を用いてこれと比較する。

#### 【0059】

このアッセイはまた、抗体ハイブリダイゼーションに基づく免疫学的アッセイの範囲のいずれか1つであり得、そしてこのコントロール抗体は、それらの標識を検出する手段によって（例えば、ビオチン化抗体の場合、ストレプトアビジンを用いてか、または酵素標識に関連する発色性基質（例えば、ペルオキシダーゼ酵素とともに3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジン（TMB）基質）を用いることによってか、あるいは放射能標識を単に検出することによって）検出される。コントロール抗体と同一のエピトープに結合する抗体は、結合を効果的に競合し得、従って、結合した標識の減少によって証明されるようにコントロール抗体結合を有意に減少する。

#### 【0060】

完全に無関係な抗体の非存在下でのこの（標識した）コントロール抗体の反応は、コントロールの高値である。コントロールの低値は、競合が起こり、そして標識化抗体の結合を減少する場合、標識化（2C3）抗体を正確に同一の型（2C3）の未標識の抗体とインキュベートすることによって得られる。試験アッセイにおいて、試験抗体の存在下での標識化抗体の反応性の有意な減少は、同一のエピトープを認識する試験抗体を示す（すなわち、この標識（2C3）抗体と「

交差反応」する抗体)。

#### 【0061】

有意な減少は、「再現可能」である（すなわち、結合の減少が一貫して観察される）。本発明の用語において「有意な減少」は、約1：10と約1：100との間の任意の比で少なくとも約70%、約75%または約80%の（ELISAにおいてVEGFに結合する2C3の）再現可能な減少として定義される。なおよりストリンジェントな交差遮断活性を有する抗体は、約1：10と約1：100との間の任意の比で少なくとも約82%、約85%、約88%、約90%、約92%、または約95%あるいはその程度の（ELISAまたはその他の適切なアッセイにおいてVEGFに結合する2C3の）再現可能な減少を示す。本発明を実施するのに決して必要でないが、約99%、約98%、約97%、または約96%あるいはその程度のVEGFに結合する2C3の再現可能な減少を示すような交差遮断の競合または近競合は、確実に除外されない。

#### 【0062】

本発明は、モノクローナル抗体2C3によって例示されるか、ATCC PTA 1595ハイブリドーマによって産生されるか、またはこのようなモノクローナル抗体の抗原結合フラグメントである。モノクローナル抗体2C3（ATCC PTA 1595）として実質的に同一のエピトープと結合する、モノクローナル抗VEGF抗体を産生するハイブリドーマは、本発明の別の局面である。

#### 【0063】

本発明は、少なくとも第1の免疫原性VEGF成分を用いて、動物を免疫する工程、および免疫された動物からモノクローナル抗体2C3（ATCC PTA 1595）で実質的に交差反応する抗体を選択する工程を包含するプロセスによって調製されるモノクローナル抗体2C3（ATCC PTA 1595）として実質的に同一のエピトープと結合する、抗VEGF抗体；ならびに少なくとも第1の免疫原性VEGF成分を用いて、動物を免疫する工程、および免疫された動物からVEGFに対する2C3抗体の結合を実質的に減少させる抗体を同定することによって交差反応する抗VEGFを選択する工程を包含するプロセスによって調製されるモノクローナル抗体2C3（ATCC PTA 1595）と

して実質的に同一のエピトープと結合する、抗VEGF抗体を、さらに提供する。

#### 【0064】

モノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と実質的に同じエピトープに結合し、そしてVEGFレセプターVEGFR2(KDR/F1k-1)に結合するVEGFを特異的に阻害する、抗VEGF抗体、またはその抗原結合フラグメント；ならびにモノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と実質的に同じエピトープに結合し、そしてVEGFレセプターVEGFR1(F1t-1)に結合するVEGFを実質的に阻害することなく、VEGFレセプターVEGFR2(KDR/F1k-1)に結合するVEGFを阻害する、抗VEGF抗体、またはその抗原結合フラグメントが、本発明の他の局面を形成する。

#### 【0065】

このような特性の組み合わせを有する抗体は、レセプター競合、ELISA、共沈、および／または機能的アッセイ、ならびに上記の2C3交差反応性アッセイの1以上または組み合わせによって容易に同定され得る。VEGFR2に結合するVEGFを一貫して有意に減少させ、そしてVEGFR1に結合するVEGFを一貫して有意に阻害しない、2C3様抗体の定量評価に関する誘導は、上記の通りである。

#### 【0066】

2C3は、VEGFR2コートELISAウエルに結合するVEGFの量を、VEGFよりも100倍および1000倍を超えるモル数で、それぞれ約26%および19%減少させることが本明細書において示された。これらの数字は、それぞれ約74%および81%の、VEGFR2に結合するVEGFの減少に等しい。2C3は、VEGFR2コートELISAウエルに結合するVEGFの量を、VEGFよりも100倍および1000倍を超えるモル数で、それぞれ約92%および105%維持することが本明細書中において示された。

#### 【0067】

VEGFR2に結合するVEGFをより実質的に阻害する、2C3様抗体また

は交差反応性抗体が、VEGFR1との結合において、より低い耐性を有し得ることがさらに理解される。同様に、抗体がVEGFR2に結合するVEGFにおいて穏やかな減少を有する場合、VEGFR1への結合の維持は、より厳密に追跡されなければならない。

#### 【0068】

従って、本発明のさらに例示的な抗VEGF抗体（および抗原結合フラグメント）は、以下：

（a）ウエスタンブロットでVEGFに結合することによってアッセイされるように、非立体配置的に独立したVEGFエピトープに結合する抗体；

（b）遊離VEGFに結合する抗体；

（c）VEGFレセプターVEGFR2（KDR／Flk-1）に結合するVEGFを有意に阻害する抗体；

（d）VEGFレセプターVEGFR1（Flt-1）に結合するVEGFを有意に阻害しない抗体；

（e）VEGFR2のVEGF誘導リン酸化を阻害、および好ましくは有意に阻害する抗体；

（f）VEGF誘導血管透過性を阻害、および好ましくは有意に阻害する抗体；

（g）VEGF媒介内皮細胞増殖を阻害、および好ましくは有意に阻害する抗体；

（h）血管形成を阻害、および好ましくは有意に阻害する抗体；

（i）マクロファージ、破骨細胞または軟骨吸収細胞のVEGFR1媒介刺激または活性化を有意に阻害しない抗体；

（j）血管新生腫瘍で動物へ投与する際に、腫瘍血管および腫瘍ストローマに局在化する抗体；ならびに

（k）モノクローナル抗体2C3（ATCC PTA 1595）として同一かまたは実質的に同一のエピトープと結合する抗体である。

#### 【0069】

本発明に関連する、組成物、免疫結合体、医薬品、配合、カクテル、キット、

第1および第2医学的使用ならびに全方法の以下の記載において、用語「抗体」および「免疫結合体」、またはその抗原結合領域は、具体的に記載または科学的な用語から明らかにされない限り、VEGFR2遮断、抗-VEGF抗体の範囲および特異的な2C3交差反応抗体を言及する。

#### 【0070】

本明細書において使用されるように、用語「抗体」および「免疫結合体」は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を含む、任意の免疫学的な結合剤を広範に言及する。重鎖における定常ドメインのタイプに依存して、抗体は、5つの主なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMの1つに割り当てられる。これらの数種は、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4などのようなサブクラスまたはアイソタイプにさらに分類される。イムノグロブリンの異なるクラスに対応する、重鎖定常ドメインを、それぞれ $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ および $\mu$ と呼ぶ。このサブユニット構造およびイムノグロブリンの異なるクラスの3次元構造は、周知である。

#### 【0071】

一般に、抗原結合領域以外の抗体が、本発明において使用される場合、IgGおよび/またはIgMが、好ましい。なぜならば、これらは、生理学的状態において最も一般的な抗体であり、そしてこれらは、実験室の設定において最も容易に実施されるからである。

#### 【0072】

哺乳動物の抗体の「軽鎖」は、2種の明らかに異なるタイプ：カッパ( $\kappa$ )およびラムダ( $\lambda$ )に割り当てられ、これらは、定常ドメインのアミノ酸配列に基づく。本発明の抗体において、 $\kappa$ または $\lambda$ 軽鎖の使用は、本質的に好ましくない。

#### 【0073】

モノクローナル抗体(MAbs)またはその誘導体の使用がより好ましい。MAbsは、特定の利点(例えば、再現性および大規模の産生)を有すると認識され、これらは、医療処置に適切である。従って、本発明は、マウス、ヒト、サル、ラット、ハムスター、ウサギおよびさらにカエルまたはトリの原種のモノクロ

ーナル抗体を提供する。マウス、ヒトまたはヒト化モノクローナル抗体が、一般に好ましい。

#### 【0074】

当業者に理解されるように、免疫学的結合剤は、全ての種由来の全ての抗体、およびその抗原結合フラグメントに及ぶ用語「抗体」に含まれ、これには、2量体、3量体および多量体の抗体；部位特異的抗体；化学的抗体；ヒトおよびヒト化抗体；組換えおよび遺伝子組換え抗体；ならびにそのフラグメントが挙げられる。

#### 【0075】

従って、用語「抗体」は、抗原結合領域を有する任意の抗体様分子を言及するために使用され、そしてこの用語は、F a b'、F a b、F (a b')<sub>2</sub>、単一のドメイン抗体 (D A B)、F v、s c F v (単一鎖F v)、直鎖抗体、ダイアボディー (d i a b o d y) などのような抗体フラグメントを含む。種々の抗体ベース構造およびフラグメントを調製および使用するための技術は、当該分野で周知である (K a b a t ら、1991 (本明細書においてその参考として特に援用される) を参照のこと)。特にダイアボディーは、E P 404, 097 および W O 93/11161 (それぞれ本明細書においてその参考として特に援用される) にさらに記載される。一方、直鎖抗体は、Z a p a t a ら (1995) (本明細書においてその参考として特に援用される) にさらに記載される。

#### 【0076】

特定の実施形態において、本発明の組成物は、少なくとも第1抗-V E G F 抗体を含み、この第1抗-V E G F 抗体は、配列番号7または配列番号9のアミノ酸配列と少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約85%、より好ましくは少なくとも約90%、そして最も好ましくは少なくとも約95%または同じアミノ酸配列のアミノ酸配列領域を含む少なくとも第1可変領域を含む、少なくとも第1可変領域を含む。ここで、上記抗-V E G F 抗体は、2 C 3 抗体によって例示されるような、本発明の V E G F R 2-遮断、抗-V E G F 抗体の生物学的な特性を少なくとも実質的に保持する。



## 【0077】

本発明のこれらおよび他の抗-VEGF抗体配列に関する同一性または相同性は、配列番号7または配列番号9の配列、または配列をアニーリングおよびギャップを導入した後の本発明の別の抗-VEGF抗体の配列と同じ候補配列中のアミノ酸残基の割合として本明細書中において定義され、必要であれば、配列同一性の最大の割合を達成する。配列比較のために使用されるVEGFR2-遮断、抗-VEGF抗体の実質的に同一、またはさらにより有効な生物学的特性の維持は、特に重要である。このような比較は、例えば、本明細書において記載される1以上の種々のアッセイを使用して、容易に実施される。

## 【0078】

特定の好ましい実施形態において、本発明の抗-VEGF抗体は、配列番号7または配列番号9のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列領域を含む少なくとも第1可変領域を含む。これは、配列番号6または配列番号8の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列領域を含む可変領域によって例示される。このような配列は、重鎖および軽鎖の可変領域のCDR1-3（相補的決定領域）を含む、2C3ScFvのVhおよびVkの配列である。

## 【0079】

他の好ましい実施形態において、オリジナルのVEGFR2-遮断、抗-VEGF抗体（例えば2C3）と比較して、増強したまたは優れた特性を有する、第2世代の抗体が提供される。例えば、第2世代の抗体は、より強力な結合親和性、VEGFR2に結合するVEGFのより有効な遮断、VEGFR2に結合するVEGFのより特異的な遮断、VEGFR1に結合するVEGFのさらに弱い遮断、VEGF誘導された内皮細胞の増殖および／または移動を阻害するための増強した能力、VEGF誘導された血管透過性を阻害するための優れた能力、ならびに好ましくは、血管新生化腫瘍を含む、インビボにおいてVEGF誘導血管形成を阻害および血管疾患を処置するための増加した能力を有し得る。

## 【0080】

有効な第2世代抗体を同定するための比較が、例えば、本明細書に詳細に記載される1以上の種々のアッセイを使用して、容易に処理および定量される。2C

3抗体によって例示されるように、本発明のVEGFR2-遮断、抗-VEGF抗体と比較して、少なくとも約10倍、好ましくは少なくとも20倍、およびより好ましくは少なくとも約50倍の増強した生物学的特性または活性を有する第2世代抗体、本発明によって意図される。

#### 【0081】

特定の実施形態において、使用される抗体は、「ヒト化」、部分的ヒトまたはヒト抗体である。「ヒト化」抗体は、一般にマウス、ラットまたは非ヒト種からのキメラモノクローナル抗体であり、ヒト定常領域および／または種々の領域ドメイン（「部分的ヒトキメラ抗体」）を有する。本発明において使用される種々のヒト化モノクローナル抗体は、キメラ抗体であり、ここでマウス、ラットまたは他の非ヒトモノクローナル抗体の、少なくとも第1抗原結合領域、または相補性決定領域（CDR）が、ヒト抗体定常領域または「フレームワーク」上に作動可能に結合または「接ぎ木」されている。

#### 【0082】

本明細書中の使用のための「ヒト化」モノクローナル抗体はまた、非ヒト種からのモノクローナル抗体であり得、ここで、1つ以上の選択されたアミノ酸が、ヒト抗体中でより一般に観察されるアミノ酸に交換されている。これは、慣用的な組換え技法、特に部位特異的変異誘発の使用により容易に達成され得る。

#### 【0083】

「ヒト化」よりむしろ完全にヒトの抗体もまた調製され、そして本発明において用いられ得る。このような抗体はまた、健常被験体から得られ得る。これを達成するために、抗原提示細胞および抗体産生細胞を含む、ヒト被験体からの混合末梢血リンパ球の集団を単に得、そしてこの細胞集団を、免疫学的に有効な量のアミノリン脂質サンプルと混合することによりインビトロで刺激する。このヒト抗VEGF抗体産生細胞が一旦得られると、ハイブリドーマおよび／または組換え抗体産生に用いられる。

#### 【0084】

ヒトモノクローナル抗体産生のためのさらなる技法は、トランスジェニック動物、好ましくはトランスジェニックマウスを免疫化することを包含し、これは、

免疫学的に有効な量のVEGFサンプルをとまうヒト抗体ライブラリーを含む。これはまた、ハイブリドーマおよび／または組換え抗体産生においてさらなる操作のためのヒト抗VEGF抗体産生細胞を生成し、末梢血細胞よりもむしろ脾細胞が、トランスジェニック動物またはマウスから容易に得られ得るという利点を持つ。

#### 【0085】

本発明に従ってVEGFR2遮断、抗-VEGF抗体は、以下を含むプロセスおよび方法によって容易に調製され得る：

(a) 候補抗体産生細胞を調製する工程；および

(b) 候補抗体産生細胞から抗体を選択する工程であって、VEGFR2 (KDR/F1k-1) に結合するVEGFを有意に阻害し、そしてVEGFレセプターVEGFR1 (Flt-1) に結合するVEGFを有意に阻害しない、工程。

#### 【0086】

本発明に従った他の抗体は、モノクローナル抗体2C3 (ATCC PTA 1595) と実質的に交差反応する抗体を選択することによって容易に調製され得る。適切な調製プロセスおよび方法は、以下を含む：

(a) 候補抗体産生細胞を調製する工程；および

(b) モノクローナル抗体2C3 (ATCC PTA 1595) と実質的に交差反応する抗体を、候補抗体産生細胞から選択する工程。

#### 【0087】

適切な抗体産生細胞を調製し、そしてそれから抗体を得る1つのプロセスは、所与の患者においてインサイチュで実施され得る。すなわち、患者に、免疫原的に有効な量の免疫原性VEGFサンプルを単に提供することで、適切な抗体生成を生じる。従って、この抗体は、抗体産生細胞からなお「得られる」が、宿主から離れて単離され、そして引き続き、患者に提供されなければならないことなく、自然に腫瘍血管系に局在化し、そしてその生物学的抗腫瘍効果を奏し得る。しかし、このような実施形態は、顕著な特異性の欠如に起因して好ましくない。

## 【0088】

適切な抗体産生細胞がまた得られ得、引き続いて、抗体は、末梢血液リンパ球をインビトロにおいてVEGFで刺激することによって単離および／または精製され得る。

## 【0089】

他の方法は、少なくとも第1免疫原性VEGF成分を含む免疫化組成物を動物に投与する工程、ならびにVEGFR2 (KDR/F1k-1) に結合するVEGFを有意に阻害し、VEGFレセプターVEGFR1 (Flt-1) に結合するVEGFを有意に阻害しない抗体、および必要に応じてモノクローナル抗体2C3 (ATCC PTA 1595) と実質的に交差反応する抗体を、免疫化した動物から選択する工程を包含する。これらの方法は、以下の工程を包含する：

(a) 少なくとも1用量、および必要に応じて1以上の用量の免疫学的に有効量の免疫原性VEGFサンプル（例えば、第1ヒトVEGF成分、実質的に完全長のVEGF成分、または組換えヒトVEGF）で動物に投与することにより動物を免疫化する工程；ならびに

(b) 適切な抗体産生細胞を免疫化した動物から得る工程であって、例えば、抗体産生細胞は、VEGFR2 (KDR/F1k-1) に結合するVEGFを有意に阻害し、VEGFレセプターVEGFR1 (Flt-1) に結合するVEGFを有意に阻害しない抗体、および必要に応じてモノクローナル抗体2C3 (ATCC PTA 1595) と実質的に交差反応する抗体をを産生する、工程。

## 【0090】

免疫的に有効量のVEGFサンプルを、VEGF結合体としてまたは任意の適切なアジュバント（例えば、フロイント完全アジュバント）と組み合わせて投与し得る。任意の経験的技術または改変は、免疫原性を増加するために使用され得る。インタクトな実質的に完全長のヒトVEGFが、一般的に免疫原として好ましい。

## 【0091】

免疫化プロセスの性質または免疫される動物の種類に関係なく、適切な抗体産生細胞は、その免疫される動物から得られ、そして好ましくは、人の手によって

さらに操作される。本明細書中で使用される場合、「免疫された動物」は、他に明確に記載しない限り、非ヒト動物である。任意の抗体産生細胞が使用され得るが、最も好ましくは、抗体産生細胞の供給源として脾臓細胞が得られる。抗体産生細胞は、以下を包含する調製工程において使用され得る：

(a) 抗VEGF抗体産生細胞を不死細胞と融合して、本発明に従ってモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを調製する工程、ならびに

(b) このハイブリドーマから本発明に従って適切な抗VEGF抗体を得る工程。

#### 【0092】

「適切な」抗VEGF抗体産生細胞、ハイブリドーマおよび抗体は、VEGFR2-遮断抗VEGF抗体を産生するか、VEGFR2-遮断抗VEGF抗体として存在する細胞、ハイブリドーマおよび抗体であり、このVEGFR2-遮断抗VEGF抗体は、VEGFR2 (KDR/F1k-1) に対するVEGF結合を有意に阻害し、そしてVEGFレセプターVEGFR1 (F1t-1) に対するVEGF結合を有意には阻害せず、そして必要に応じてモノクローナル抗体2C3 (ATCC PTA 1595) と実質的に交差反応する抗体である。

#### 【0093】

従って、ハイブリドーマに基づくモノクローナル抗体調製方法は、以下を包含する方法を包含する：

(a) 少なくとも1用量の（必要に応じて1用量より多くの）免疫学的に有効量の免疫原性VEGFサンプル（好ましくは、インタクトなヒトVEGFサンプル）を動物に投与することによって、この動物を免疫する工程；

(b) 免疫された動物からモノクローナル抗体産生ハイブリドーマのコレクションを調製する工程；

(c) 本発明に従って少なくとも第1のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体、必要に応じてモノクローナル抗体2C3 (ATCC PTA 1595) と実質的に交差反応する抗VEGF抗体を産生する少なくとも第1のハイブリドーマをこのコレクションから選択する工程；および

(d) 少なくとも第1のVEGFR2-遮断抗VEGFモノクローナル抗体を

提供するために少なくとも第1の抗体産生ハイブリドーマを培養する工程；ならびに、好ましくは、

(e) 培養された少なくとも第1のハイブリドーマから第1のVEGFR2-遮断抗VEGFモノクローナル抗体を得る工程。

#### 【0094】

モノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と実質的に交差反応する抗VEGF抗体を同定する際に、この選択工程は、以下を包含し得る：

(a) VEGFサンプルをモノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)および候補抗体の有効量と接触させる工程；および

(b) VEGFサンプルに対する2C3抗体の結合を実質的に減少する、候補抗体の能力を決定する工程であって；ここで、このVEGFサンプルに対する2C3抗体の結合を実質的に減少する候補抗体の能力が、モノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と実質的に同じエピトープに結合する抗VEGF抗体の指標である、工程。

#### 【0095】

選択工程は、さらに以下を包含し得る：

(a) 第1のVEGFを、有効な結合量のモノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)を接触させる工程、およびVEGFに結合する2C3の量を決定する工程；

(b) 第2VEGFを、有効な結合量のモノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と、有効競合量の候補抗体と組み合わせて接触させる工程、および候補抗体の存在下でVEGFに結合する2C3の量を決定する工程；ならびに

(c) VEGFに結合する2C3の量を、好ましくは少なくとも約80%減少する候補抗体を選択することによって、モノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と実質的に同じエピトープに結合する抗VEGF抗体を同定する工程。

#### 【0096】

非ヒト動物が免疫化のために使用される場合、このようなハイブリドーマから

得られるモノクローナル抗体は、しばしば非ヒト構成 (make up) を有する。このような抗体は、必要に応じて、当該分野で公知であるような、そして本明細書中でさらに記載されるような、ヒト化プロセス、移植または変異に供され得る。あるいは、ヒト抗体遺伝子ライブラリーを含むトランスジェニック動物（例えばマウス）が使用され得る。従って、このような動物の免疫化は、直接、適切なヒト抗体の生成を生じる。

#### 【0097】

適切な抗体産生細胞（最も好ましくはハイブリドーマ）の産生の後に、ヒト抗体または非ヒト抗体を産生するか否かにかかわらず、モノクローナル抗体をコードする核酸は、「組換え」モノクローナル抗体を調製するためにクローン化され得る。任意の組換えクローニング技術（抗体コード核酸配列の合成をプライムするためのPCR<sup>TM</sup>の使用を含む）が利用され得る。従って、なおさらに適切なモノクローナル抗体調製方法は、以下のように抗体産生細胞を使用する工程を包含する方法を包含する：

（a）適切な抗VEGF抗体産生細胞（好ましくは、ハイブリドーマ）から少なくとも第1の適切な抗VEGF抗体をコードする核酸分子またはセグメントを得る工程；および

（b）本発明に従って、組換えVEGFR2-遮断抗VEGFモノクローナル抗体を得るために、組換え宿主細胞において、この核酸またはセグメントを発現する工程。

#### 【0098】

しかし、組換えモノクローナル抗体の調製に理想的に適する他の強力な組換え技術が利用可能である。このような組換え技術は、ファージミドライブラリーに基づくモノクローナル抗体調製方法を包含し、これは、以下を包含する：

（a）少なくとも1用量の（必要に応じて1用量より多くの）免疫学的に有効量の免疫原性VEGFサンプル（例えば、インタクトなヒトVEGFサンプル）を動物に投与することによって、この動物を免疫する工程；

（b）免疫された動物の抗体産生細胞（好ましくは脾臓）から単離されたRNAを発現するコンビナトリアル免疫グロブリンファージミドライブラリーを調製

する工程；

(c) 少なくとも第1のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体、必要に応じてモノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と実質的に交差反応するものを発現する少なくとも第1のクローンをファージミドライブラリーから選択する工程；

(d) 少なくとも第1の選択されたクローンからVEGFR2-遮断抗VEGF抗体をコードする核酸を得る工程、および少なくとも第1のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体を提供するために組換え宿主細胞においてこの核酸を発現する工程；ならびに、好ましくは、

(e) 少なくとも第1のクローンから得られた核酸によって発現される少なくとも第1のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体を得る工程。

#### 【0099】

また、このようなファージミドライブラリーに基づく技術において、ヒト抗体遺伝子ライブラリーを保有するトランスジェニック動物が使用され得、組換えヒトモノクローナル抗体を産生する。

#### 【0100】

第1のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体核酸セグメントの調製方法に関係なく、さらに適切な抗体核酸セグメントは、標準的な分子生物学技術によって容易に調製され得る。任意の改変体、変異体または第二世代のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体核酸セグメントが本発明の使用に適することを確認するために、核酸セグメントは、本発明に従って、VEGFR2-遮断抗VEGF抗体の発現を確認するために試験される。好ましくは、改変体、変異体または第二世代の核酸セグメントはまた、標準的な、より好ましくは、標準的なストリンジェントハイブリダイゼーション条件下でのハイブリダイゼーションを確認するために試験される。例示的に適切なハイブリダイゼーション条件は、約7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、約0.5M NaPO<sub>4</sub>、約1mM EDTA中、約50℃でのハイブリダイゼーション；および約1%SDS、約42℃での洗浄を包含する。

#### 【0101】



種々の組換えモノクローナル抗体が、ヒト由来または非ヒト由来に関わらず、容易に調製され得るので、本発明の処置方法は、患者において少なくとも第1のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体の生物学的有効量を発現する少なくとも第1の核酸セグメントを動物または患者に提供することによって実施され得る。「VEGFR2-遮断、抗VEGF、2C3様または2C3に基づく抗体を発現する核酸セグメント」は、一般的に、少なくとも発現構築物の形態であり、ウイルス内または組換え宿主細胞内で構成される発現構築物の形態であり得る。本発明の好ましい遺伝子治療ベクターは、一般的に、組換えレトロウイルス、単純ヘルペスウイルス(HSV)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、サイトメガロウイルス(CMV)などの中で構成されるようなウイルスベクターである。

#### 【0102】

本発明は、さらに、少なくとも第1の精製されたVEGFR2-遮断抗VEGF抗体、またはその抗原結合フラグメント、必要に応じてモノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と基本的に同じエピトープに結合するものを含む組成物を提供する。このような組成物は、研究所の研究における使用のために薬学的に受容可能な組成物であり得る。薬学的組成物の点で、これらは、好ましくは、静脈内投与のような、非経口的な投与のために処方され得る。

#### 【0103】

本発明は、VEGFR2-遮断抗VEGF抗体(2C3-交差反応性抗体、2C3様抗体または2C3に基づく抗体を含む)についての多くの方法および使用を提供する。全ての方法に関して、記載された方法において、用語「a」および「an」は、「少なくとも1」、「少なくとも第1の」、「1以上」、または「複数」の工程(具体的に記載される場合を除く)を意味するために使用される。これは、特に、処置方法における投与工程に関連する。従って、異なる用量が本発明に使用され得るだけでなく、異なる数の用量(例えば、注射)が、複数注射まで、そして複数注射を含んで使用され得る。組み合わせ治療が、抗VEGF治療抗体の投与の前、後、またはその間に投与されて、使用され得る。

#### 【0104】

重要な生物学的意味を有する種々の有用なインビトロ方法および使用が提供される。第1に、VEGFを結合する方法およびその使用が提供され、これは、一般的に、VEGFを含む組成物（好ましくは、自由な（free）（非レセプター結合）VEGF）を含む組成物を、少なくとも第1のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体、またはその抗原結合フラグメント、必要に応じてモノクローナル抗体2C3（ATCC PTA 1595）と実質的に同じエピトープに結合する抗体と、有効に接触する工程を包含する。

#### 【0105】

VEGFを検出する方法、およびその使用が提供され、これは、一般的に、VEGFを含むと疑われる組成物を、少なくとも第1のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体、またはその抗原結合フラグメント、必要に応じてモノクローナル抗体2C3（ATCC PTA 1595）と実質的に同じエピトープに結合するものと、VEGF/抗体複合体の形成を可能にするのに有効な条件下で接触させる工程、およびそのように形成される複合体を検出する工程を包含する。この検出の方法および使用は、例えば、新脈管形成および腫瘍に対する診断において、生物学的サンプルと関連して使用され得、これに基づく診断キットもまた提供される。

#### 【0106】

本発明は、VEGFレセプターVEGFR2に結合するVEGFを優先的または特異的に阻害する方法およびその使用を提供し、これは、一般的に、VEGF存在下で、VEGFR2（KDR/F1k-1）を発現する内皮細胞を含む細胞または組織の集団を、生物学的に有効量の少なくとも第1のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体、必要に応じてモノクローナル抗体2C3（ATCC PTA 1595）と実質的に同じエピトープに結合するもの、またはその抗原結合フラグメントを含む組成物と、VEGFレセプターVEGFR2に結合するVEGFを阻害するのに有効な条件下で接触する工程を包含する。

#### 【0107】

VEGFレセプターVEGFR1に結合するVEGFを実質的に阻害することなく、VEGFレセプターVEGFR2に結合するVEGFを実質的に阻害する

方法、およびその使用が提供される。これらの方法は、VEGFの存在下で、VEGFR2 (KDR/F1k-1) およびVEGFR1 (Flt-1) を発現する内皮細胞の集団を含む細胞または組織の集団を、生物学的に有効量の少なくとも第1のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体、必要に応じてモノクローナル抗体2C3 (ATCC PTA 1595) と実質的に同じエピトープに結合する抗VEGF抗体、またはその抗原結合フラグメントを含む組成物と、VEGFレセプターVEGFR1に結合するVEGFを有意に阻害しないで、VEGFレセプターVEGFR2に結合するVEGFを阻害するのに有効な条件下で接触させる工程を包含する。

#### 【0108】

本発明のさらなる方法およびその使用は、VEGFR2およびVEGFR1と呼ばれるVEGFレセプターの生物学的な役割を分析する工程においてであり、これは、以下の工程を包含する：

(a) VEGFならびにVEGFR2 (KDR/F1k-1) およびVEGFR1 (Flt-1) を発現する細胞の集団を含む生物学的組成物または組織を、生物学的に有効量の少なくとも第1のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体、必要に応じてモノクローナル抗体2C3 (ATCC PTA 1595) と実質的に同じエピトープに結合する抗VEGF抗体、またはその抗原結合フラグメントを含む組成物と接触する工程；および

(b) VEGFR2-遮断抗VEGF抗体の、VEGFに対する少なくとも第1の生物学的応答に対する効果を決定する工程であって、ここで：

(i) VEGFR2-遮断抗VEGF抗体の存在下での生物学的応答における変化が、VEGFR2レセプターによって媒介される応答の指標であり；そして

(ii) VEGFR2-遮断抗VEGF抗体の存在下での生物学的応答の維持が、VEGFR1レセプターによって媒介される応答の指標である、工程。

#### 【0109】

VEGF誘導内皮細胞増殖および／または遊走 (migration) を特異的に阻害する方法および使用を含む増殖阻害方法およびその使用が提供され、こ

れは、一般的に、VEGFおよび内皮細胞の集団を含む細胞または組織の集団を、生物学的に有効量の少なくとも第1のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体、必要に応じてモノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と実質的に同じエピトープに結合するもの、またはVEGFR2-遮断抗VEGF抗体の抗原結合フラグメントを含む組成物と、VEGF誘導内皮細胞増殖および／または遊走を阻害するのに有効な条件下で接触させる工程を包含する。

#### 【0110】

VEGF誘導マクロファージ化学走性を有意に阻害することなく、VEGF誘導内皮細胞増殖および／または遊走を阻害する方法およびその使用が提供され、これは、一般的に、内皮細胞、マクロファージおよびVEGFを含む細胞または組織の集団を、生物学的に有効量の少なくとも第1のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体、必要に応じてモノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と実質的に同じエピトープに結合するもの、または抗VEGF抗体の抗原結合フラグメントを含む組成物と、VEGF誘導マクロファージ化学走性を有意に阻害することなく、VEGF誘導内皮細胞増殖および／または遊走を阻害するのに有効な条件下で接触させる工程を包含する。

#### 【0111】

マクロファージ、破骨細胞または軟骨吸収細胞のVEGF刺激を有意に阻害することなく、VEGF誘導内皮細胞増殖および／または遊走、ならびに必要なに応じて新脈管形成を阻害する方法およびその使用がさらに提供される。この方法は、一般的に、内皮細胞およびマクロファージ、破骨細胞または軟骨吸収細胞の内の少なくとも一つを含む細胞または組織の集団を、生物学的に有効量の少なくとも第1のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体、必要に応じてモノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と実質的に同じエピトープに結合するもの、または抗体の抗原結合フラグメントを含む組成物と、マクロファージ、破骨細胞または軟骨吸収細胞のVEGF刺激を有意に阻害することなく、VEGF誘導内皮細胞増殖および／または遊走、あるいは新脈管形成を阻害するのに有効な条件下で接触させる工程を包含する。

#### 【0112】

前述の方法および使用は、インビトロおよびインビボで実行され得る。後者の場合、ここで、組織または細胞は、動物内に配置され、そして抗VEGF抗体が動物に投与される。両方の場合に、方法および使用は、血管形成を阻害する方法および使用になる。これは、潜在的に脈管形成性の血管を含む組織、または潜在的に脈管形成性の血管の集団（すなわち、可能性としてVEGFに曝露されるもの）を、脈管形成を阻害するのに効果的な条件下で、抗脈管形成組成物（生物学的に効果的な量の少なくとも第1のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体（必要に応じて、モノクローナル抗体2C3（ATCC PTA 1595）と実質的に同じエпитープ、またはその抗原結合フラグメントに結合するもの）を含む）に接触させる工程を包含する。

#### 【0113】

潜在的に脈管形成性の血管の集団がエキソビボで維持される場合、本発明は、薬物開発プログラムにおいて有用性を有する。インビトロスクリーニングアッセイにおいては、確実な陽性コントロールおよび陰性コントロールが、新脈管形成を阻害または促進する薬物の開発において、および脈管形成プロセスに対するさらなる情報の描写において、第1の工程として有用である。潜在的に脈管形成性の血管の集団が動物または患者内に配置される場合、抗脈管形成性組成物が、治療の形態として動物に投与される。

#### 【0114】

従って、前述の阻害方法のそれぞれの立場から、「生物学的に有効な量」とは、VEGF誘導内皮細胞増殖および／または細胞移動を阻害し；VEGF誘導マクロファージ走化性を有意に阻害することなく、VEGF誘導内皮細胞増殖および／または細胞移動を阻害し；マクロファージ、破骨細胞、または軟骨吸収細胞のVEGF刺激を有意に阻害することなく、VEGF誘導内皮細胞増殖および／または細胞移動もしくは新脈管形成を阻害し；そして全体として、血管増殖もしくは新脈管形成を阻害するのに有効な様式で血管内皮細胞の増殖および／または移動を減弱するのに有効な、VEGFR2遮断抗VEGF抗体（必要に応じて2C3-ベースの抗体）の量である。

#### 【0115】

従って、本発明は、VEGF誘導性新脈管形成を阻害する方法、およびその阻害における使用、ならびに好ましくは、マクロファージ、破骨細胞、または軟骨吸収細胞のVEGF刺激を有意に阻害することなく、脈管形成性疾患を処置する方法およびその処置における用途を提供する。この方法は、一般に、内皮細胞および少なくとも1つのマクロファージ、破骨細胞、または軟骨吸収細胞を含む細胞または組織の集団を、組成物と接触させる工程を包含する。この組成物は、生物学的に有効な量の少なくとも第1のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体（必要に応じて、モノクローナル抗体2C3（ATCC PTA 1595）と実質的に同じエピトープ、またはこの抗体の抗原結合フラグメントに、VEGF誘導新脈管形成を阻害するのに有効で、かつマクロファージ、破骨細胞、または軟骨吸収細胞のVEGF刺激を有意に阻害することなく、脈管形成性疾患を処置するのに有効な条件下で、結合するもの）を含む。

#### 【0116】

骨代謝に有意な副作用を生じることなく、VEGF誘導性新脈管形成を阻害する方法およびその阻害における用途、そして好ましくは抗脈管形成疾患を処置する方法およびその処置における用途がさらに提供される。この方法は、一般に、血管内皮細胞および少なくとも1つのマクロファージ、破骨細胞、または軟骨吸収細胞を含む脈管形成性血管の組織または集団を、組成物と接触させる工程を包含する。この組成物は、生物学的に有効な量の少なくとも第1のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体（必要に応じて、モノクローナル抗体2C3（ATCC PTA 1595）と実質的に同じエピトープ、またはこの抗体の抗原結合フラグメントに、VEGF誘導新脈管形成を阻害するのに有効で、かつマクロファージ、破骨細胞、または軟骨吸収細胞の活性を有意に障害しないことにより、骨代謝に有意な副作用を生じることなく、脈管形成性疾患を処置するのに有効な条件下で、結合するもの）を含む。

#### 【0117】

抗脈管形成性薬物のスクリーニング（インビトロ）および治療（インビボ）は、所望されない、不適切な、異常な、過剰なおよび／または病理的な血管新生により特徴付けられる任意の疾患または障害を有するか、またはそのような疾患を

発症する危険性がある、動物および患者の立場から提供される。異常な新脈管形成が広範な疾患および障害において生じること、任意の受容可能なモデル系において、効果的であることが一旦示された所定の抗脈管形成治療が、新脈管形成に関連する全範囲の疾患および障害を処置するのに用いられ得ることが、当業者に周知である。

#### 【0118】

本発明の方法および用途は、特に、任意の形態の血管新生された腫瘍；黄斑変性症（加齢性黄斑変性を含む）；関節炎（慢性関節リウマチを含む）；アテローム性動脈硬化症およびアテローム斑；糖尿病性網膜症および他の網膜症；甲状腺過形成（グレーブス病を含む）；血管腫；血管新生緑内障；および乾癬を有するか、またはそのような疾患を発症する危険性がある、動物および患者における使用を意図している。

#### 【0119】

本発明の方法および用途は、動静脈奇形（AVM）、髄膜腫および血管再狭窄（血管形成術後の再狭窄を含む）を有するか、またはそのような疾患を発症する危険性がある、動物および患者の処置をさらに意図している。治療方法および用途の他の意図される標的は、血管線維腫、皮膚炎、子宮内膜症、血友病性関節、過形成性癭痕、炎症性疾患および障害、化膿性肉芽腫、強皮症、滑膜炎、トラコーマおよび血管癒着、を有するか、またはそのような疾患を発症する危険性がある、動物および患者である。

#### 【0120】

米国特許第5,712,291号（本明細書において参考として詳細に援用される）に記載のように、前述のいくらか好ましい処置群の各々は、決して、本発明により処置されるべきである状態の網羅的な型ではない。米国特許第5,712,291号は、特定の特異的な目的のために本明細書において参考として援用される。この目的は、抗脈管形成治療により効果的に処置され得る多数の他の状態を同定する目的；一旦、新脈管形成阻害化合物の規定されたカテゴリーが開示および請求されれば、全ての脈管形成性疾患の処置が統一された概念を示す目的（本発明の場合、VEGFR2-遮断抗VEGF抗体（必要に応じ、モノクローナ

ル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と実質的に同じエピトープに結合するもの)；ならびに全ての脈管形成性疾患の処置が単一のモデル系のみによ来するデータにより可能であることを示す目的、を含む。

#### 【0121】

なおさらなる局面において、そして本明細書において参考として援用される米国特許第5,712,291号に記載の様に、本発明の方法および使用は、血管結合組織の異常増殖、赤鼻、後天性免疫不全症候群、動脈閉塞、アトピー性角膜炎、細菌性潰瘍、ベーチエット病、血液産生腫瘍(blood borne tumor)、頸動脈閉塞性疾患、化学熱傷、脈絡膜血管新生、慢性炎症、慢性網膜剥離、慢性ブドウ膜炎、慢性硝子体炎、コンタクトレンズ疲弊、角膜移植片拒絶、角膜血管新生、角膜移植片血管新生、クローン病、イールズ病、流行性角結膜炎、真菌性潰瘍、単純疱疹感染、带状疱疹感染、過粘稠度症候群、カポジ肉腫、白血病、脂質変性、ライム病、辺縁角質炎、モーレン潰瘍、癩以外のマイコバクテリア感染、近視、眼の血管新生疾患、視神経乳頭の先天的な構造上の欠損、オスラーウェーバー症候群(オスラーウェーバーRendu)、骨関節炎、ページエット病、毛様体輪炎(pars planitis)、類天疱瘡、phlyctenulosis、多発性動脈炎、レーザー後合併症、原生動物感染、弾性線維性偽性黄色腫、翼状片角膜炎乾燥症、放射状角膜切開術、網膜血管新生、未熟児網膜症、水晶体後方線維増殖症、サルコイド、強膜炎、鎌状赤血球貧血、シェーグレン症候群、固形腫瘍、シュタルガルト病、スティーブンジョンソン病、上部辺縁角膜炎、梅毒、全身性エリテマトーデス、テリエン辺縁変性、トキソプラズマ症、外傷、ユーイング肉腫の腫瘍、神経芽細胞腫の腫瘍、骨肉腫の腫瘍、網膜芽細胞腫の腫瘍、横紋筋肉腫の腫瘍、潰瘍性大腸炎、静脈閉塞、ビタミンA欠失およびヴェーゲナーサルコイドーシスを有するか、またはそのような疾患を発症する危険性がある、動物および患者の処置を意図する。

#### 【0122】

本発明はさらに、動脈炎を有するか、または動脈炎を発症する危険性のある、動物および患者の処置のための方法および用途を提供する。これは、通常、本明細書において参考として詳細に援用される、米国特許第5,753,230号に



記載の免疫学的因子を用いた動脈炎の処置による。米国特許第5,972,922号がまた、本明細書において参考として詳細に援用されており、糖尿病、寄生生物病、異常な創傷治癒、手術後過形成、火傷、傷害または外傷、毛髪成長不全、排卵および黄体形成の阻害、子宮での着床阻害および胚発生の阻害に関連する所望されない新脈管形成の処置に対する抗脈管形成ストラテジーの適用をなおさらに例証する。従って、前述の条件の全てが本発明の方法および使用による処置のために意図される。

#### 【0123】

米国特許第5,639,757号は、本明細書において参考としてさらに詳細に援用され、移植片拒絶の一般的処置に対する抗脈管形成のストラテジーの使用を例証する。VEGF阻害に基く抗脈管形成ストラテジーを用いた、肺炎症、ネフローゼ症候群、子癇前症、心内膜液浸出（心膜炎に関連するものを含む）および胸水の処置は、WO 98/45331（本明細書において参考として詳細に援用されている）に記載されている。従って、前述の任意の状態を有するか、またはそれを発症する危険性のある動物および患者は、本発明の方法および使用による処置を意図される。

#### 【0124】

WO 98/16551（本明細書において参考として詳細に援用される）に記載されるように、VEGF機能を拮抗（アンタゴナイズ）する生物学的分子はまた、所望されない血管透過性により特徴付けられる疾患および障害の処置における使用に適切である。従って、本明細書の方法および用途の、VEGF拮抗抗体は、所望されない血管透過性により特徴付けられる疾患および障害（例えば、脳腫瘍に伴う浮腫、悪性腫瘍に伴う腹水、メグズ（メイグス）症候群、肺炎症、ネフローゼ症候群、心内膜液浸出および胸水など）を有するか、またはそれを発症する危険性のある動物および患者の処置に適用可能である。

#### 【0125】

前述の疾患全ての処置は、統合された本発明内で可能であるが、本発明の方法および使用の特に好ましい局面は、血管新生した固体腫瘍、転移性腫瘍または原発性腫瘍からの転移を有するか、または発症する危険性のある動物および患者へ

の抗脈管形成療法の適用である。

【0126】

VEGF誘導脈管形成を阻害する方法およびこの阻害における使用、そして好ましくは、マクロファージ、破骨細胞、または軟骨吸収細胞のVEGF刺激を有意に阻害することなく、抗腫瘍効果または改善された抗腫瘍効果をもたらす、方法およびこれにおける使用が、さらに提供される。この方法は、一般に、血管内皮細胞および少なくとも1つのマクロファージ、破骨細胞、または軟骨吸収細胞を含む、組織、腫瘍環境または脈管形成性血管の集団を、組成物と接触させる工程を包含する。この組成物は、生物学的に有効な量の少なくとも第1のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体（必要に応じて、モノクローナル抗体2C3（ATCC PTA 1595）と実質的に同じエピトープ、またはこの抗体の抗原結合フラグメントに、マクロファージ、破骨細胞、または軟骨吸収細胞のVEGF刺激を有意に阻害することなく、VEGF誘導新脈管形成を阻害するのに有効で、かつ抗腫瘍効果もしくは改善された抗腫瘍効果を発揮するのに有効な条件下で、結合するもの）を含む。

【0127】

従って、本発明はさらに、新脈管形成に関連するガンの全ての形態を含む、新脈管形成に関連する疾患を処置する方法およびこの処置における使用を提供する。この方法は、このような疾患またはガンを有する動物または患者に、治療上有効な量の少なくとも第1の薬学的組成物（VEGFR2-遮断抗VEGF抗体（必要に応じて、モノクローナル抗体2C3（ATCC PTA 1595）と実質的に同じエピトープ、またはこのようなVEGF抗体の抗原結合フラグメントもしくは免疫結合体に結合するもの）を投与する工程を包含する。

【0128】

本発明は、非結合体化抗体または裸の抗体およびそのフラグメントを用いる抗脈管形成方法、ならびに免疫結合体を用いる血管標的方法（ここで、抗体またはその抗原結合フラグメントは、治療剤に作動可能に結合される）の両方を組み合わせる。従って、他に特に言及するか、または科学用語において明白にされない限り、本明細書において用いる場合、用語「抗体およびそのフラグメント」は、

「結合体化されていないかまたは裸の」抗体またはフラグメントを意味する。これは、別の薬剤（特に治療薬または診断薬）には結合されていない。これらの定義は、抗体の改変（例えば、単に例としてであるが、抗体の生物学的半減期、親和性、結合活性、もしくは他の特性を改善するような改変、または抗体と他のエフェクターとの組み合わせ）を除外しない。

#### 【0129】

本発明の抗脈管形成処置の方法および使用はまた、結合体化されていないかまたは裸の抗体および免疫結合体の両方の使用を包含する。免疫結合体ベースの抗脈管形成処置方法においては、抗体またはその抗原結合フラグメントが、好ましくは、第2の抗脈管形成因子（第1の抗脈管形成因子である、抗VEGF抗体自体）に作動可能に連結される。結合された抗脈管形成因子は、直接または間接の抗脈管形成効果を有する因子であり得る。

#### 【0130】

抗脈管形成処置方法および使用は、新脈管形成に関連する疾患（新脈管形成に関連するガンの全ての形態を含む）を有する動物または患者に、治療的に有効な量の少なくとも第1の薬学的組成物を投与する工程を包含する。この薬学的組成物は、結合体化されていないかもしくは裸のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体、またはその抗原結合フラグメント（必要に応じて、モノクローナル抗体2C3（ATCC PTA 1595）と実質的に同じエピトープに結合する）を含む。同様に、投与された抗体は、第2の抗脈管形成因子と作動可能に会合され得る。

#### 【0131】

転移性ガンを処置するための方法、およびその処置における使用は、転移性ガンを有する動物および患者に、治療的に有効な量の少なくとも1つの薬学的組成物を投与する工程を包含する。この薬学的組成物は、少なくとも第1の結合体化されていないかしくは裸のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体、またはその抗原結合フラグメント（必要に応じて、モノクローナル抗体2C3（ATCC PTA 1595）と実質的に同じエピトープに結合するもの）を含む。さらなる方法は、投与された抗体が、第2の抗脈管形成因子と作動可能に連結され得る方

法である。

#### 【0132】

原発性ガンからの転移を減少させるための方法および減少させるにおける使用は、原発性ガンを有するかまたは原発性ガンについて処置された動物および患者に、治療的に有効な量の少なくとも1つの第1の結合体化されていないかもしくは裸のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体、またはその抗原結合フラグメントを投与する工程を包含する；ここでこの結合体化されていないかもしくは裸のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体、またはその抗原結合フラグメントは、必要に応じて、モノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と実質的に同じエピトープに結合する。同様に、投与された抗体は、第2の抗脈管形成因子と作動可能に会合され得る。

#### 【0133】

新脈管形成に関連する疾患（新脈管形成に関連するガンの全ての形態を含む）を処置するための方法、およびその処置における使用は、このような疾患（例えば、血管新生化腫瘍）を有する動物または患者に、少なくとも第1の結合体化されていないかしくは裸のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体、（必要に応じて、モノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と実質的に同じエピトープまたはその抗原結合フラグメントに結合するもの）を、この疾患部位もしくは血管新生腫瘍内の新脈管形成を阻害するのに効果的な量で、投与する工程をさらに含む。同様に、投与された抗体は、第2の抗脈管形成因子と作動可能に会合され得る。

#### 【0134】

新脈管形成に関連する疾患（新脈管形成に関連するガンの全ての形態を含む）を処置するための方法、およびその処置における使用は、このような疾患またはガンを有する動物または患者に、少なくとも第1の結合体化されていないかしくは裸のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体、（必要に応じて、モノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と実質的に同じエピトープに結合するもの）、またはその抗原結合フラグメントを、VEGFがVEGFレセプターVEGFR2(KDR/Flk-1)に結合するのを阻害して、これにより、こ

の疾患またはガンの部位内の新脈管形成を阻害するのに効果的な量で、投与する工程をさらに含む。投与された抗体は、あるいは、第2の抗脈管形成因子と作動可能に会合され得る。

#### 【0135】

新脈管形成に関連する疾患（新脈管形成に関連するガンの全ての形態を含む）を処置するための方法、およびその処置における使用はまた、血管新生腫瘍を有する動物または患者に、治療的に有効な量の少なくとも第1の結合体化されていないかもしくは裸のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体、（必要に応じて、モノクローナル抗体2C3（ATCC PTA 1595）と実質的に同じエピトープまたはその抗原結合フラグメントに結合するもの）、を投与する工程を包含する；ここで、抗VEGF抗体は、VEGFがVEGFレセプターVEGFR1（Flt-1）に結合するのを有意に阻害することなく、VEGFがVEGFレセプターVEGFR2（KDR/Flk-1）に結合するのを実質的に阻害する。同様に、投与された抗体は、第2の抗脈管形成因子と作動可能に会合され得る。

#### 【0136】

新脈管形成に関連する疾患（新脈管形成に関連するガンの全ての形態を含む）を処置するためのなおさらなる方法、およびその処置における使用は、このような疾患、ガンまたは血管新生腫瘍を有する動物または患者に、治療的に有効な量の少なくとも第1の結合体化されていないかもしくは裸のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体、（必要に応じて、モノクローナル抗体2C3（ATCC PTA 1595）と実質的に同じエピトープまたはその抗原結合フラグメントに結合するもの）を投与する工程を包含する；ここで、抗VEGF抗体は、VEGFがVEGFレセプターVEGFR1（Flt-1）に結合するのを有意に阻害することなく、VEGFがVEGFレセプターVEGFR2（KDR/Flk-1）に結合するのを実質的に阻害し、これにより動物におけるマクロファージ走化性を有意に障害することなく、疾患部位、ガンまたは血管新生腫瘍内の新脈管形成を阻害する。投与された抗体は、第2の抗脈管形成因子と作動可能に会合され得る。

#### 【0137】

新脈管形成に関連する疾患（新脈管形成に関連するガンの全ての形態を含む）を処置するためのなおさらなる方法、および処置における使用は、このような疾患、ガンまたは血管新生腫瘍を有する動物または患者に、治療的に有効な量の少なくとも第1の結合体化されていないかしくは裸のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体、（必要に応じて、モノクローナル抗体2C3（ATCC PTA 1595）と実質的に同じエピトープまたはその抗原結合フラグメントに結合するもの）を投与する工程を包含する；ここで、抗VEGF抗体は、VEGFがVEGFR1（Flt-1）に結合するのを有意に阻害することなく、VEGFがVEGFR2（KDR/Flk-1）に結合するのを実質的に阻害し、これにより動物におけるマクロファージ、破骨細胞、および／または軟骨吸収細胞の活性を有意に阻害することなく、疾患部位、ガンまたは血管新生腫瘍内の新脈管形成を阻害する。同様に、投与された抗体は、第2の抗脈管形成因子と作動可能に会合され得る。

#### 【0138】

新脈管形成に関連した疾患（新脈管形成に関連した癌の全ての形態を含む）を処置するための方法およびその処置の際の使用は、このような疾患（例えば、血管新生腫瘍）を有する動物または患者に、少なくとも第1の結合体化されていないかまたは裸のVEGFR2遮断抗VEGF抗体、必要に応じて、モノクローナル抗体23（ATCC PTA 1595）と実質的に同じエピトープに結合するもの、またはそれらの抗原-結合フラグメントを、骨代謝に有意な悪影響をおよぼすことなく、疾患部位または血管新生腫瘍内の新脈管形成を阻害するのに有効な量で投与する工程をさらに包含する。

#### 【0139】

上記の抗-血管形成処置の方法および使用は、一般に、哺乳動物または患者に、全身的に（例えば、経皮的注射、筋肉注射、静脈内注射などによって）、薬学的に有効な組成物を投与する工程を包含する。しかし、血管形成部位（単数または複数）（腫瘍または腫瘍内の血管内皮細胞を含む）に治療用薬剤が局在化することが可能である投与の任意の経路は、受容可能である。従って、送達のための適切な経路として、経口、直腸、経鼻、局所、膺が挙げられる。米国特許第5, 7

12, 291号は、血管形成の疾患または障害の処置と組み合わせて含まれ得る投与の種々の経路のさらなる説明のために参考として本明細書中に特に援用される。

#### 【0140】

関節炎の処置のための使用および方法について、本明細書中において参考として特に援用される米国特許第5,753,230号に他の免疫学的薬剤について記載されるように、例えば、滑液包内投与が使用され得る。眼に関連する状態について、眼の処方および投与が考慮される。

#### 【0141】

本明細書中で使用される「投与」は、抗血管形成効果および／または抗腫瘍効果を発揮するのに有効な量および時間の、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの治療剤の提供または送達を意味する。タンパク様の治療剤の受動的な投与は、一般に、一部、その簡潔さおよび再現性のために好ましい。

#### 【0142】

しかし、用語「投与」は、本明細書中において、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの治療剤が腫瘍血管系に送達されるかまたは他の方法で提供される任意かつ全ての手段をいうように使用される。従って、「投与」は、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの治療剤を、腫瘍への送達を生じるのに有効な様式で産生する細胞の提供を含む。このような実施形態において、選択的に浸透可能な膜、構造または移植可能なデバイス、概して治療を中断するために除去され得るものに、細胞を処方または包装することが所望され得る。外因性のVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3様物投与が、さらに一般的に好ましく、これは、用量が綿密にモニターかつ制御されることを可能にする非侵襲性の方法を表す。

#### 【0143】

本発明の治療学的方法および使用はまた、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの治療剤を、腫瘍の近傍または腫瘍へのそれらの局在において、それらの発現を生じるのに有効な様式でコードする核酸の提供に拡張する。裸DNA送達、組換え遺伝子およびベクター、細胞ベースの送達のような任意の遺

伝子治療技術（患者の細胞などのエキソビボ操作を含む）が使用され得る。

【0144】

なおさらなる実施形態において、本発明は、疾患に関連した血管形成の血管に選択された治療剤または診断学的薬剤を送達するための、および送達する方法を提供する。このような実施形態は、好ましくは、腫瘍または腫瘍内血管系または間質にも選択された治療剤または診断学的薬剤を送達するために使用され、そして、VEGFR2遮断抗VEGF抗体またはそれらの抗原結合フラグメント、必要に応じて、モノクローナル抗体2C3（ATCC PTA1595）と実質的に同じエピトープに結合するものに、診断学的薬剤または治療用薬剤が作動可能に結合される少なくとも第1の免疫結合体を含む生物学的に有効な量の組成物を、血管新生化された腫瘍を有する哺乳動物または患者に投与する工程を包含する。

【0145】

本発明の標的化局面を内在する作用の機構を理解することはこのような実施形態を実施するために必要とされないが、本発明の抗体が、それらの上に発現されたVEGFR1に結合したVEGFに結合することによって血管形成および腫瘍の血管系に、結合した薬剤を送達すると考えられる。従って、本発明のこれらの方法および使用は、血管形成の血管、腫瘍または腫瘍内血管系に、選択された治療剤または診断学的薬剤を送達することに関し、血管形成の血管、腫瘍または腫瘍内血管系で発現されるか、過剰発現されるか、またはアップレギュレートされるVEGFR1に結合したVEGFに抗体が結合することを可能にするのに有効な様式で、少なくとも第1のVEGFR2遮断抗VEGF抗体またはそれらの抗原結合フラグメント、必要に応じてモノクローナル抗体2C3（ATCC PTA1595）と実質的に同じエピトープに結合するものに、診断学的薬剤または治療用薬剤が作動可能に結合される免疫結合体を含む、生物学的に有効な量の組成物を、処置が必要な哺乳動物または患者に投与する工程、すなわち、血管形成の血管、腫瘍または腫瘍内血管系のVEGF-VEGFR1に診断学的薬剤または治療用薬剤を送達する工程を包含する。

【0146】



腫瘍または腫瘍内血管系または間質への選択された治療薬剤の送達は、血流を止めるために、または特に腫瘍血管系内の血流を止めるために；破壊するために、または特に腫瘍血管系を破壊するために；および壊死を誘発するために、または腫瘍内の特異的な壊死を誘発するために、作用する。従って、これらの方法および使用は、血管形成された腫瘍を有する哺乳動物または患者を処置するための方法として要約され得、この方法は、作動可能に治療薬剤に結合される、VEGF R2遮断抗VEGF抗体、必要に応じてモノクローナル抗体2C3（ATCC PTA 1595）と実質的に同じエピトープに結合するもの、またはそれらの抗原結合フラグメントを含む少なくとも第1の免疫結合体を含む、治療学的に有効な量の少なくとも第1の薬学的組成物を、哺乳動物または患者に投与する工程を包含する。

#### 【0147】

本発明における使用のための「治療学的に有効な量」は、少なくとも一部の腫瘍または腫瘍内の血管内皮細胞を特異的に殺傷するために；少なくとも一部の腫瘍または腫瘍内血管内皮細胞に細胞死を特異的に誘発するために；少なくとも一部の腫瘍または腫瘍内血管に特異的に凝固を促進するために；腫瘍の少なくとも一部の血液輸送血管を特異的に閉塞または破壊するために；少なくとも一部の腫瘍内に特異的に壊死を誘発するために；および／または選択された哺乳動物または患者への投与の際に腫瘍の後退または寛解を誘発するために、有効な、VEGF R2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの免疫結合体の量である。このような効果が達成される一方で、正常で健康な組織内の血管内皮細胞への結合がほとんどまたは全くないか、あるいは正常で健康な組織内の血管内皮細胞の殺傷がほとんどまたは全くないことを示し；健康で正常な組織内の血管の閉塞または破壊の際の凝固がほとんどまたは全くないことを示し；そして哺乳動物または患者の正常で健康な組織におよぼす無視できるまたは扱いやすい有害な副作用を示す。

#### 【0148】

従って、腫瘍血管系内の凝固を促進する状況、または腫瘍血管系を破壊する状況、および／または腫瘍間質に結合する状況、および／または腫瘍壊死をもたら

す状況において、本明細書中で使用される用語「好ましくは」および「特に」は、V E G F R 2 遮断抗 V E G F 抗体または 2 C 3 ベースの免疫結合体が、実質的に腫瘍間質、血管系および腫瘍部位に制限される間質の結合、凝固、破壊および／または腫瘍壊死を達成するように機能することを意味し、そして哺乳動物または被験体の正常で健康な組織内の凝固、破壊および／または組織壊死に実質的に拡張しない。従って、健康な細胞および組織の構造および機能は、本発明の実施によって実質的に弱められずに維持される。

#### 【0149】

本発明の抗体は、V E G F R 1 に関連した V E G F に結合することによって血管形成および腫瘍の血管系に薬剤を有効に送達するが、他の方法および使用が治療学的薬剤を腫瘍間質に送達することに基づいて作動し、ここでそれは付近の血管への治療学的効果を発揮する。これらの方法および使用は、腫瘍間質内の非レセプター結合 V E G F に免疫結合体を結合するのに有効な量で、少なくとも第1の V E G F R 2 遮断抗 V E G F 抗体、またはそれらの抗原結合フラグメント、必要に応じてモノクローナル抗体 2 C 3 (A T C C P T A 1 5 9 5) と実質的に同じエピトープに結合するものに作動可能に結合された治療学的薬剤を含む免疫結合体を、血管形成腫瘍を有する哺乳動物または患者に投与する工程を包含する。

#### 【0150】

これらの方法および使用は、腫瘍間質内で免疫結合体を局在化するのに有効な量で、少なくとも第1の V E G F R 2 遮断抗 V E G F 抗体、またはそれらの抗原結合フラグメント、必要に応じてモノクローナル抗体 2 C 3 (A T C C P T A 1 5 9 5) と実質的に同じエピトープに結合するものに作動可能に結合された治療学的薬剤を含む免疫結合体を、血管形成腫瘍を有する哺乳動物または患者に投与し、その結果、結合された治療用薬剤が、周囲の腫瘍血管系および／または腫瘍細胞に抗腫瘍効果を発揮する工程を包含する。

#### 【0151】

本発明の組成物ならびに方法および使用は、作動可能に少なくとも第1の治療用薬剤または診断用薬剤に結合される、少なくとも第1の V E G F R 2 遮断抗 V

E G F 抗体、またはそれらの抗原結合フラグメント、必要に応じてモノクローナル抗体 2 C 3 (A T C C P T A 1 5 9 5) と実質的に同じエピトープに結合するものを含む、V E G F R 2 遮断抗 V E G F 抗体または 2 C 3 ベースの免疫結合体を含む組成物に拡張する。V E G F R 2 遮断抗 V E G F 抗体または 2 C 3 ベースの治療用結合体は、好ましくは、放射線療法薬剤、抗血管形成薬剤、細胞死誘発薬剤、抗チューブリン薬剤、抗細胞性薬剤または細胞障害性薬剤、あるいは凝血薬（凝固因子）に連結される。

#### 【0152】

従って、本発明は抗体が少なくとも第 1 の治療用薬剤または診断用薬剤に作動可能に結合される、ある範囲の結合体化された抗体およびそれらのフラグメントを提供する。用語「免疫結合体」は、抗体と別の有効な薬剤との有効な結合を規定するために広く使用され、専ら任意の型の有効な結合をいうことは意図されなく、そして特に化学的「結合体化」に限定されない。組換え融合タンパク質が、特に考慮される。送達薬剤または標的化薬剤が標的に結合し得、そして治療用薬剤または診断用薬剤が送達の際に十分に機能的である限り、結合の態様は適切である。

#### 【0153】

抗体の糖質部分を介する薬剤の結合がまた、考慮される。糖化（O-結合および N-結合の両方）が、抗体内で天然に起こる。組換え抗体は、所望される場合、追加の糖化部位を再生または生成するために改変され、これは、適切なアミノ酸配列（A s n - X - S e r、A s n - X - T h r、S e r、または T h r）を抗体の一次配列内に操作することによって容易に達成される。

#### 【0154】

V E G F R 2 遮断抗 V E G F 抗体または 2 C 3 ベースの治療用結合体の使用、および関連した方法および使用のための現在好ましい薬剤は、抗体および／または特定の腫瘍の型または患者について選択された抗体の効果を補足するかまたは向上する薬剤である。「抗体の効果を補足するかまたは向上する治療用薬剤」として、放射線療法薬剤、抗血管形成薬剤、細胞死誘発薬剤および抗チューブリン薬物、本明細書中における使用のために好ましい任意の 1 つ以上の薬剤が挙げら

れる。

#### 【0155】

好ましい薬剤と、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体との結合 (attachment or association) は、「免疫結合体」を与え、ここで、このような免疫結合体は、しばしば、向上された、さらに相乗的な抗腫瘍特性を有する。この様式における使用のための現在好ましい抗血管形成薬剤は、アンギオスタチン (angiostatin)、エンドスタチン (endostatin)、アンギオポイエチン (angiopoietin)、バスクロスタチン (vasculostatin)、カンスタチン (canstatin) およびマスピン (maspin) のいずれか1つである。現在好ましい抗チューブリン薬物として、コルヒチン、タキソール、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデスチンおよびコンブレタスタチン (combretastatin) の1つ以上が挙げられる。

#### 【0156】

抗細胞性薬剤および細胞障害性薬剤の使用は、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの「免疫毒素」を生じ、一方で、凝固因子の使用は、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの「コアグリガンド (coaguligand)」を生じる。少なくとも2つの治療用薬剤（例えば、1つ以上の放射線療法薬剤、抗血管形成薬剤、細胞死誘発薬剤、抗チューブリン薬物、抗細胞性薬剤および細胞障害性薬剤および凝固因子の組み合わせ）の使用もまた考慮される。

#### 【0157】

特定の適用において、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの治療剤は、内皮細胞を殺傷する能力または内皮細胞の増殖または細胞分裂を抑制する能力を有する細胞障害性薬剤、細胞増殖抑制性薬剤または他の抗細胞性薬剤に作動可能に結合される。適切な抗細胞性薬剤として、化学療法薬剤、ならびに細胞毒素および細胞増殖抑制性薬剤が挙げられる。細胞増殖抑制性薬剤は、一般に、標的細胞の天然の細胞循環を乱し、好ましくはその結果細胞が細胞循環から取り除かれる、薬剤である。

## 【0158】

代表的な化学療法薬剤として、ステロイド；サイトカイン；抗代謝産物（例えば、サイトカインアラビノシド、フルオロウラシル、メトトレキセートまたはアミノプテリン）；アントラサイクリン；ミトマイシンC；ビンカアルカロイド；抗生物質；デメコルチン；エトポシド；ミトラマイシン；および抗腫瘍アルキル化剤（例えば、クロランブシルまたはメルファラン）が挙げられる。実際には、本明細書中の表Cに開示される薬剤のいずれかが使用され得る。特定の好ましい抗細胞性薬剤は、DNA合成インヒビター（例えば、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、アドリアマイシンなど）である。

## 【0159】

特定の治療適用において、他の潜在的な薬剤と比較して、毒素部分は、大部分の毒素が細胞殺傷効果を送達するはるかに大きな能力のために、好ましい。従って、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体構築物にための特定の好ましい抗細胞性薬剤は、植物由来毒素、真菌由来毒素、または細菌由来毒素である。代表的な毒素として、エピポドフィロ毒素（epipodophyllotoxin）；細菌性内毒素または細菌性内毒素の脂質A部分；リボソーム不活性化タンパク質（例えば、サポリン（saporin）またはゲロニン（gelonin））； $\alpha$ -サルチン（ $\alpha$ -sarcin）；アスペルジリン（aspergillin）；レストリクトチン（restrictocin）；リボヌクレアーゼ（例えば、胎盤リボヌクレアーゼ）；ジフテリア毒素およびシュードモナス体外毒素が挙げられる。

## 【0160】

好ましい毒素は、A鎖毒素（例えば、リシンA鎖）である。最も好ましい毒素部分は、しばしば、糖質残基を改変または除去するように処理されているリシンAであり、「脱グリコシル化したA鎖（dgA）」と呼ばれる。脱グリコシル化したリシンA鎖は、その極度の効力、長い寿命のため、そしてそれが臨床的な等級および規模で製造することが経済的に容易であるため、好ましい。組換えリシンA鎖および／または短縮型リシンA鎖がまた、使用され得る。

## 【0161】

腫瘍標的化および免疫毒素による処置のために、以下の特許および特許出願が、特に、抗細胞性薬剤および細胞障害性薬剤に関する本教示をさらに補足するために、本明細書中において参考として援用される：米国出願第07/846,349号；同第08/295,868（米国特許第6,004,554号）；同第08/205,330号（米国特許第5,855,866号）；同第08/350,212号（米国特許第5,965,132号）；同第08/456,495号（米国特許第5,776,427号）；同第08/457,487号（米国特許第5,863,538号）；同第08/457,229号および同第08/457,031（米国特許第5,660,827号）および同第08/457,869号（米国特許第6,051,230号）。

#### 【0162】

本発明の2C3ベースの抗VEGF抗体または他のVEGFR2遮断抗VEGF抗体は、抗チューブリン薬物に連結され得る。本明細書中で使用される「抗チューブリン薬物」は、好ましくは、細胞有糸分裂に必要なチューブリン活性（好ましくは、チューブリン重合またはチューブリン脱重合）を直接的または間接的に阻害することによって、細胞有糸分裂を阻害する任意の薬剤、薬物、プロドラッグまたはそれらの組み合わせを意味する。

#### 【0163】

本明細書中での使用のための現在好ましい抗チューブリン薬物は、コルヒチン；タキサン（例えば、タキソール）；ビンカアルカロイド（例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチンおよびビンデシン）；およびコンブレタスタチン（combreastatin）である。代表的なコンブレタスタチンは、コンブレタスタチンA、Bおよび／またはD（A-1、A-2、A-3、A-4、A-5、A-6、B-1、B-2、B-3、B-4、D-1およびD-2を含む）およびそれらのプロドラッグ形態である。

#### 【0164】

VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの治療剤は、凝固を促進し得る成分（すなわち、凝固剤）を含み得る。ここで、標的化抗体は、凝固を直接的にまたは間接的に刺激する因子に、例えば別の抗体を介して、直接的にまた

は間接的に連結され得る。

#### 【0165】

このような使用のための好ましい凝固因子は、Tissue Factor (TF) およびTF誘導体(例えば、短縮型のTF (tTF)、二量体化TF、三量体化TF、重合体化TF/多量体化TF、および第VII因子を活性化する能力に欠ける変異体TF)である。他の適切な凝固因子として、ビタミンK依存凝固剤(例えば、第II/IIa因子、第VII/VIIa因子、第IX/IXa因子および第X/Xa因子)；Gla改変を欠くビタミンK依存凝固因子；Russellクサリヘビ毒液第X因子活性化剤；血小板活性化化合物(例えば、トロンボキサンA<sub>2</sub>およびトロンボキサンA<sub>2</sub>シンターゼ)；およびフィブリン溶解のインヒビター(例えば、 $\alpha$ 2-抗プラスミン)が挙げられる。

#### 【0166】

コアグリガンドを用いる腫瘍標的化および処置は、以下の特許および特許出願に記載され、それらの各々は、特にコアグリガンドおよび凝固因子に関する本教示をなおさらに補強するために参考として本明細書中に援用される：米国出願第07/846,349号；同第08/205,330(米国特許第5,855,866号)；同第08/350,212号(米国特許第5,965,132号)；同第08/273,567号；同第08/482,369号(米国特許第5,\_\_\_\_,\_\_\_\_号；1998年10月20日に特許証発行料金支払い)；同第08/485,482号；同第08/487,427号(米国特許第6,004,555号)；同第08/479,733号(米国特許第第5,877,289号)；および同第08/472,631；同第08/479,727号および同第08/481,904号(米国特許第6,036,955号)。

#### 【0167】

免疫結合体および免疫毒素の調製は、一般的に当該分野において周知である(例えば、本明細書中において参考として援用される米国特許第4,340,535号を参照のこと)。以下の特許および特許出願は、免疫毒素の発生、精製および使用に関する本教示をなおさらに補充するために参考として本明細書中にさらに援用される：米国出願第07/846,349号；同第08/295,868

(米国特許第6, 004, 554号) ; 同第08/205, 330号 (米国特許第5, 855, 866号) ; 同第08/350, 212号 (米国特許第5, 965, 132号) ; 同第08/456, 495号 (米国特許第5, 776, 427号) ; 同第08/457, 487号 (米国特許第5, 863, 538号) ; 同第08/457, 229号および同第08/457, 031 (米国特許第5, 660, 827号) および同第08/457, 869号 (米国特許第6, 051, 230号)。

#### 【0168】

免疫結合体および免疫毒素の調製において、特定のリンカーの使用を通して利点が達成され得る。例えば、立体的に「かさ高い (hindered)」ジスルフィド結合を含むリンカーは、インビボにおけるそれらのより大きな安定性のために、好ましく、従って作用部位での結合の前の、毒素部分の放出を防止する。一般に、作用の意図される部位（この点で、結合体が良好な「放出」特性を有することが所望される）を除く身体のいかなる箇所に見出される条件下でインタクトなままである結合体を有することが所望される。

#### 【0169】

使用される特定の毒素化合物に依存して、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体および毒素化合物を作動可能に接着するペプチドスペーサーを提供することが必要であり得る。ここで、このペプチドスペーサーは、ジスルフィド結合したループ構造に折り畳まれ得る。次いで、ループ内のタンパク質分解性切断が、ヘテロダイマーポリペプチドを産生し、ここで、抗体および毒素化合物は、単一のジスルフィド結合のみによって結合される。

#### 【0170】

特定の他の毒素化合物が利用される場合、非切断性ペプチドスペーサーが、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体および毒素化合物を作動可能に接着するように提供され得る。非切断性ペプチドスペーサーとともに使用され得る毒素は、それ自体がタンパク質分解性切断によって細胞傷害性ジスルフィド結合形態に変換され得る毒素である。このような毒素化合物の例は、Pseudomonas外毒素化合物である。



## 【0171】

種々の化学療法剤および他の薬物がまた、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの治療法に首尾良く結合体化され得る。抗体に結合体化される例示的な抗悪性腫瘍薬としては、ドキソルビシン、ダウノマイシン、メトトレキサートおよびビンブラスチンが挙げられる。さらに、他の薬剤（例えば、ネオカルチノスタチン、マクロマイシン（*macromycin*）、トレニモン（*trenimon*）および $\alpha$ -アマニチン）の接着が記載されている（米国特許第5,660,827号；同第5,855,866号；および同第5,965,132号を参照のこと；各々は、本明細書中で援用される）。

## 【0172】

本発明者らの以前の研究のうちの1つに鑑みて、コアグリガンド（*coagulant ligand*）の調製は、ここでまた、容易に行われる。VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体との、1つ以上の凝固因子の作動可能な会合は、直接的な連結（イムノトキシンについての上記の連結のような）であり得る。あるいは、作動可能な会合は、間接的な接着（例えば、抗体が、第二の結合領域、好ましくは、凝固因子に結合する、抗体または抗体の抗原結合領域に作動可能に接着する場合）であり得る。凝固因子は、特に、共有結合が使用されて分子を結合する場合に、機能的凝固部位とは異なる部位で、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体に接着されるべきである。

## 【0173】

間接的に結合したコアグリガンドは、頻繁に、二重特異性抗体に基づく。二重特異性抗体の調製はまた、当該分野で周知である。一つの調製方法は、一方に標的化された腫瘍成分についての特異性を有し、そして他方に凝固剤についての特異性を有する抗体の分離調製を含む。次いで、2つの選択された抗体由来のペプシンF（*ab' y*）<sub>2</sub>フラグメントが生成され、その後、分離したF*ab' y*SHフラグメントを提供するように、各々が還元される。次いで、結合されるべき2つのパートナーのうちの1つに対するSH基が、架橋試薬（例えば、*o*-フェニレンジマレイミド）を用いてアルキル化されて、1つのパートナー上に遊離のマレイミド基を提供する。次いで、このパートナーは、チオエーテル結合によっ

て、他に結合体化されて、所望の  $F(a b' \gamma)_2$  ヘテロ結合体を与え得る (Glennieら、1987; 本明細書中に参考として援用される)。他のアプローチ (例えば、SPDP または プロテイン A を用いた架橋) がまた、実施され得る。

#### 【0174】

二重特異性抗体を生成するための別の方法は、2つのハイブリドーマを融合させて、クアドローマを形成する。本明細書中で使用されるように、用語「クアドローマ」は、2つのB細胞ハイブリドーマの生産的融合を記載するために使用される。この標準的技術を使用して、ハイブリドーマを生成する2つの抗体を融合して娘細胞を与え、次いで、クロナタイプの免疫グロブリン遺伝子の両方のセットの発現を維持する細胞が選択される。

#### 【0175】

クアドローマを生成する好ましい方法は、親ハイブリドーマのうちの少なくとも1つの酵素欠損変異の選択を含む。次いで、この第一の変異ハイブリドーマ細胞株を、例えば、その連続的生存を妨げるヨードアセトアミドに、致死的に曝露された第二のハイブリドーマの細胞に融合する。細胞融合は、致死的に処理されたハイブリドーマから、その酵素欠損についての遺伝子を獲得することによって、第一のハイブリドーマのレスキューを可能にし、そして第一のハイブリドーマへの融合を介した第二のハイブリドーマのレスキューを可能にする。同じアイソタイプであるが、異なるサブクラスの免疫グロブリンの融合が好ましいが、必要とはされない。混合されたサブクラスの抗体は、好ましいクアドローマの単離のための代替のアッセイの場合に使用され得る。

#### 【0176】

マイクロタイター同定実施形態、FACS、免疫蛍光染色、イディオタイプ特異的抗体、抗原結合競合アッセイおよび抗体の特徴付けの分野で一般的な他の方法が使用されて、好ましいクアドローマを同定し得る。クアドローマの単離後、二重特異性抗体が、他の細胞生成物から離れて精製される。これは、免疫グロブリン精製の分野の当業者に公知の、種々の抗体単離手順によって果たされ得る (例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, 1

988を参照のこと；本明細書中で参考として援用される）。プロテインAセファロースカラムまたはプロテインGセファロースカラムが好ましい。

#### 【0177】

免疫結合体、イムノトキシンおよびコアグリガンドの調製において、組換え発現が利用され得る。選択されたVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体および治療剤、毒素または凝固薬をコードする核酸配列が、発現ベクターにおいて、インフレーションで接着する。従って、組換え発現は、核酸の翻訳を生じ、所望の免疫結合体を産生する。化学的架橋剤およびアビジン：ビオチン架橋がまた、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体に治療剤を結合し得る。

#### 【0178】

以下の特許および特許出願が、コアグリガンド調製、精製および使用（二重特異性抗体コアグリガンドを含む）に関する本教示をいっそうさらに補う目的のために、本明細書中に参考として各々が援用される：米国出願番号07/846,349；08/205,330（米国特許第5,855,866号）；08/350,212（米国特許第5,965,132号）；08/273,567；08/482,369（米国特許第5,\_\_, \_\_号；1998年10月20日に、特許証発行料金を支払い）；08/485,482；08/487,427（米国特許第6,004,555号）；08/479,733（米国特許第5,877,289号）；08/472,631；および08/479,727および08/481,904（米国特許第6,036,955号）。

#### 【0179】

放射線療法剤、抗脈管形成因子、アポトーシス誘導因子、抗チューブリン薬物、毒素および凝固薬との免疫結合体（化学的結合体によって調製されるにせよまたは組換え発現によって調製されるにせよ）は、生物学的に遊離可能な結合および／または選択的切断可能スペーサーもしくはリンカーを利用し得る。このような組成物は、好ましくは、循環の間に適度に安定であり、そして疾患部位または腫瘍部位への送達に際して、優先的または特異的に放出される。

#### 【0180】

特定の好ましい例は、酸感受性スパーサーであり、ここで、コルヒチンまたはドキシソルビシンに結合したVEGFR2遮断抗VEGF抗体が特に意図される。他の好ましい例は、特異的もしくは優先的に存在するか、または疾患部位（例えば、腫瘍環境）内で活性である、ペプチダーゼおよび／またはプロテイナーゼのための切断部位を含むペプチドリinkerである。疾患部位または腫瘍部位への免疫結合体の送達は、凝固因子の切断および凝固因子の比較的特異的な放出を生じる。

#### 【0181】

ウロキナーゼ、プロウロキナーゼ、プラスミン、プラスミノゲン、TGF $\beta$ 、スタフィロキナーゼ (staphylokinase)、トロンビン、第IXa因子、第Xa因子またはメタロプロテイナーゼ (MMP) (例えば、間質コラゲナーゼ、ゼラチナーゼまたはストロメライシン) についての切断部位を含むペプチドリinkerは、米国特許第5, 877, 289号 (本明細書中でこのような目的のために参考として援用され、そして本明細書中の表B2において、さらに例示される) に記載され、そしてこの米国特許第5, 877, 289号によって可能にされるように、特に好ましい。

#### 【0182】

VEGFR2遮断抗VEGF抗体はまた、誘導体化されて、官能基を導入し、生物学的に遊離可能な結合を介した治療剤の接着を可能にし得る。従って、標的化抗体が誘導体化されて、側鎖を導入し、ヒドラジド基、ヒドラジン基、一級アミン基または二級アミン基を終端し得る。治療剤は、シッフ塩基結合、ヒドラゾンまたはアシルヒドラゾン結合もしくはヒドラジドリinkerを介して結合体化され得る (米国特許第5, 474, 765号および同第5, 762, 918号、各々は、本明細書中で参考として具体的に援用される)。

#### 【0183】

本来抗脈管形成性であろうと脈管標的化ベースであろうと、本発明の組成物および方法は、他の治療法および診断法と組み合わせて使用され得る。本発明に従って、VEGFR2遮断抗VEGF抗体と「組み合わせた」使用のための生物学的因子 (好ましくは、診断剤または治療剤) (例えば、2C3ベースの抗体) と

いう点では、用語「組み合わせた」は、簡潔に使用されて、実施形態の範囲にわたる。「組み合わせた」用語は、特に明記しない限り、科学用語から明らかであり、従って、組み合わせた組成物、医薬、カクテル、キット、方法ならびに第一の医療用使用および第二の医療用使用の種々の型に適用する。

#### 【0184】

従って、本発明の「組み合わせた」実施形態は、例えば、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体が、裸の抗体であり、そしてその抗体に作動可能に接着しない、薬剤または治療剤と組み合わせ使用される場合を含む。このような場合において、薬剤または治療剤は、非標的化形態または標的化形態で使用され得る。「非標的化形態」において、薬剤（特に、治療剤）は、一般的に、当該分野におけるその標準的使用に従って使用される。「標的化形態」において、薬剤は、一般的に、脈管形成疾患部位または腫瘍へ薬剤または治療剤を送達する、異なる抗体または標的化領域に作動可能に接着する。生物学的薬剤のこのような標的化形態の使用（診断法および治療法の両方）がまた、当該分野でかなり標準的である。

#### 【0185】

本発明の他の「組み合わせた」実施形態において、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体は、免疫結合体であり、ここで、抗体は、それ自体、薬剤または治療剤と作動可能に会合するか、または結合する。特定の好ましい例において、薬剤（診断剤および治療剤を含む）は、「2C3標的化薬剤」である。作動可能な接着は、本明細書中に記載され、そして当該分野で公知のように、直接的接着および間接的接着のすべての形態を含む。

#### 【0186】

「組み合わせた」使用（特に、治療剤と組み合わせたVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体という点において）はまた、組み合わせた組成物、医薬、カクテル、キット、方法ならびに第一の医療用使用および第二の医療用使用を含み、ここで、治療剤は、プロドラッグの形態にある。このような実施形態において、薬物の機能的形態へプロドラッグを変換し得る活性化成分は、本発明のVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体と、再び作

動可能に会合し得る。

【0187】

特定の好ましい実施形態において、治療組成物、組み合わせ、医薬、カクテル、キット、方法ならびに第一の医療用使用および第二の医療用使用は、「2C3プロドラッグ組み合わせ」である。当業者によって理解されるように、用語「2C3プロドラッグ組み合わせ」は、特に明記しない限り、2C3ベースの抗体が、活性薬物にプロドラッグを変換し得る成分に作動可能に接着することを意味し、2C3ベースの抗体が、プロドラッグ自体に接着することを意味しない。しかし、本発明のプロドラッグ実施形態が、2C3プロドラッグ組み合わせとして使用される必要条件は存在しない。従って、プロドラッグは、当該分野において使用される任意の様式（ADEPTおよび他の形態を含む）で使用され得る。

【0188】

従って、組み合わせた組成物、医薬、カクテル、キット、方法ならびに第一の医療用使用および第二の医療用使用が、好ましくは、診断剤およびより好ましくは、治療剤という点において記載され、組み合わせとしては、裸の抗体および免疫結合体である、VEGFR2遮断抗VEGF抗体（例えば、2C3ベースの抗体）が挙げられ、ここで、本発明のインビボ実施形態の実施は、裸の抗体または免疫結合体および生物学的因子、診断剤または治療剤の、前投与、同時投与または引き続く投与を含む；いくつかの結合体化形態または非結合体化形態の限りは、抗体のいくつかの形態、および生物学的因子、診断剤または治療剤のいくつかの形態の供給全体が達成される。

【0189】

本発明の特に好ましい組み合わせた組成物、方法および使用は、VEGFR2遮断抗VEGF抗体およびエンドスタチンを含むものである（米国特許第5,854,205号、特に、本明細書中で参考として援用される）。これらは、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3構築物が、裸の抗体または免疫結合体である場合を含み：そして免疫結合体の場合、ここで、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3は、エンドスタチン（必要に応じて、アンギオテンシンを伴う）と結合し；ここで、組み合わせた治療方法または使用は、エンドスタチン

(必要に応じて、アンギオテンシンを伴う)の前投与、同時投与または引き続く投与を含み；いくつかの結合体化形態または非結合体化形態の限りは、2C3、エンドスタチンおよび必要に応じてアンギオテンシンの供給全体が達成される。コラゲナーゼと作動可能に会合する、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体がまた、コラゲナーゼとして提供され、腫瘍に特異的に送達される場合、インサイチュでエンドスタチンを産生し、類似の利益を達成する。

#### 【0190】

腫瘍に対する本発明の効果の、上述の説明および他の説明は、単純化のためになされ、操作の組み合わせた様式、接着因子の型などを説明する。この記述的アプローチは、本発明のVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体の有利な性質の、控えめな表現または単純化のいずれかのように解釈されるべきではない。従って、このような抗体自身が、抗脈管形成性質およびVEGF中和性質（例えば、VEGFの生存機能を中和する）ことが理解され、そしてこのような抗体の免疫結合体が、これらの性質を維持し、そしてこれらの性質を接着因子の性質と結合することが理解される；そしてさらに、抗体および任意の接着因子の組み合わせた効果が、代表的には、増大されそして／または拡大されることが理解される。

#### 【0191】

従って、本発明は、組成物、薬学的組成物、治療キットおよび医療用カクテルを提供し、これらは、必要に応じて、少なくとも第一の組成物またはコンテナ中に、生物学的に有効量の少なくとも第一のVEGFR2遮断抗VEGF抗体、必要に応じて、モノクローナル抗体2C3（ATCC PTA1595）と実質的に同じエピトープに結合するものを含むか、またはこのような抗VEGF抗体の、抗原結合フラグメントもしくは免疫結合体を含む；そして生物学的に有効量の少なくとも第二の生物学的因子、成分または系を含む。

#### 【0192】

「少なくとも第二の生物学的因子、成分または系」は、しばしば、治療剤もしくは診断剤、成分または系であるが、しばしば、治療剤もしくは診断剤、成分または系ではない。例えば、少なくとも第二の生物学的因子、成分または系は、抗

体の改変のための成分および／または抗体への他の因子の接着のための成分を含み得る。特定の好ましい第二の生物学的因子、成分または系は、プロドラッグ、またはプロドラッグを作製しそして使用するための成分であり、この成分は、プロドラッグ自身を作製するための成分および本発明の抗体を適応させるための成分を含み、このようなプロドラッグまたはA D E P T実施形態において機能する。

#### 【0193】

治療剤または診断剤が、少なくとも第二の生物学的因子、成分または系として含まれる場合、このような治療法および／または診断法は、代表的には、脈管形成疾患と関係した使用のためのものである。このような因子は、米国特許第5,712,291号、同第5,753,230号、同第5,972,922号、同第5,639,757号、WO98/45331およびWO98/16551（各々は、本明細書中で参考として具体的に援用される）のいずれか1つに開示されるような、疾患または障害の、処置または診断における使用に適切な因子である。

#### 【0194】

処置されるべき疾患が癌である場合、「少なくとも第二の抗癌因子」は、治療キットまたはカクテルに含まれる。用語「少なくとも第二の抗癌因子」は、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3構築物（第一の抗癌因子である）を参照して選択される。従って、本発明の抗体は、化学療法剤、放射線療法剤、サイトカイン、抗脈管形成因子、アポトーシス誘導因子または抗癌イムノトキシンもしくはコアグリガンドと組み合わせられ得る。

#### 【0195】

本明細書中で使用されるように、「化学療法剤」は、悪性腫瘍の処置において使用される、古典的な化学療法剤または薬物をいう。この用語は、他の化合物が、抗癌効果を発揮する点において、化学療法剤として専門的に記載され得るという事実にもかかわらず、単純化のために使用される。しかし、「化学療法」は、当該分野において、異なる意味を有するようになり、そしてこの標準的な意味に従って使用されている。多くの例示的な化学療法剤が、本明細書中で記載される



。当業者は、容易に化学療法剤の使用および適切な用量を理解するが、用量は、本発明と組み合わせて使用される場合に減少され得る。

#### 【0196】

「化学療法剤」とまたよばれ得る新規のクラスの薬物は、アポトーシスを誘導する因子である。このような薬物のうちのいずれか1つ以上（遺伝子、ベクター、アンチセンス構築物およびリボザイムを含む）はまた、適切のように、本発明と組み合わせて使用され得る。現在好ましい第二の因子は、抗脈管形成因子（例えば、アンギオスタチン（angiotatin）、エンドスタチン（endostatin）、バスキュロスタチン（vasculostatin）、カンスタチン（canstatin）およびマスピン（maspin））である。

#### 【0197】

他の例示的な抗癌因子としては、例えば、ネオマイシン、ポドフィロトキシン、TNF- $\alpha$ 、 $\alpha_v\beta_3$ アンタゴニスト、カルシウムイオノフォア、カルシウムフラックス誘導因子、およびその任意の誘導体またはプロドラッグが挙げられる。現在好ましい抗チューブリン薬物としては、コルヒチン、タキソール、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン（vindesine）、コンブレタスタチン（combretastatin）またはその誘導体もしくはプロドラッグが挙げられる。

#### 【0198】

抗癌イムノトキシンまたはコアグリガンドは、抗癌因子にさらに適切である。「抗癌イムノトキシンまたはコアグリガンド」あるいは標的化因子／治療剤構築物は、標的化因子（腫瘍細胞、腫瘍脈管構造または腫瘍ストロマの、標的可能成分または接近可能成分に結合し、そして治療剤（細胞傷害性因子（イムノトキシン）および凝固因子（コアグリガンド）を含む）に作動可能に接着する、抗体またはその抗原結合フラグメントを含む）に基づく。腫瘍細胞、腫瘍脈管構造または腫瘍ストロマの、「標的可能成分または接近可能成分」は、好ましくは、表面発現成分、表面接近可能成分、または表面局在化成分であるが、ネクローシス細胞、またはそうでなければ傷害性腫瘍細胞あるいは血管内皮細胞から放出される成分（サイトゾルおよび／または核の腫瘍細胞抗原を含む）がまた標的化され得

る。

#### 【0199】

抗体標的化剤および非抗体標的化剤の両方が用いられ得、これには以下が挙げられる：VEGFおよびFGFのような増殖因子；腫瘍脈管構造に特異的に結合するトリペプチドR-G-Dを含有するペプチド；ならびにアネキシンおよび関連するリガンドのような他の標的化成分。

#### 【0200】

抗腫瘍細胞イムノトキシンまたはコアグリガンドは、B3 (ATCC HB 10573)、260F9 (ATCC HB 8488)、D612 (ATCC HB 9796) およびKS1/4と称される抗体からなる群により例証される抗体を含み得る。このKS1/4抗体は、ベクターpGKC2310 (NRRL B-18356) またはベクターpG2A52 (NRRL B-18357) を含む細胞から得られた。

#### 【0201】

壊死腫瘍細胞から放出される細胞内成分に結合する抗体またはその抗原結合領域を含む、抗腫瘍細胞標的化剤もまた意図される。好ましくは、このような抗体は、透過性となるように誘導され得る細胞中、または実質的にすべての壊死細胞および正常細胞の細胞ゴースト中に存在するが、哺乳動物の正常な生細胞の外側では存在しないかもしくはアクセス可能でない、不溶性の細胞内抗原に結合する、モノクローナル抗体、またはその抗原結合フラグメントである。

#### 【0202】

米国特許第5,019,368号、同第4,861,581号、および同第5,882,626号（各々、Alan Epsteinおよび共同研究者らに対して発行）は、インビボにおいて悪性細胞からアクセス可能となる細胞内抗原に特異的な抗体を作製および使用する方法を、よりさらに記載および教示する目的で、各々詳細に、本明細書中で参考として援用される。記載される抗体は、哺乳動物悪性細胞の内部細胞性成分に対して十分に特異的であるが、外部細胞性成分に対しては特異的ではない。例示的な標的としては、ヒストンが挙げられるが、壊死腫瘍細胞から特異的に放出されるすべての細胞内成分が、包含される。

## 【0203】

血管新生化腫瘍を有する動物または患者への投与に際して、インビボで生じそして悪性細胞の少なくとも一部分に壊死を引き起こす腫瘍リモデリングのプロセスに起因して、血管新生化腫瘍は天然に壊死腫瘍細胞を含むという事実によって、このような抗体は、悪性細胞に局在化する。さらに、腫瘍壊死を増強する他の治療と組合せたこのような抗体の使用は、標的化療法およびその後の治療の有効性を増強させるために供される。

## 【0204】

従って、抗体のこれらの型は、一般的に本明細書中に開示されるように、アンギオポエチン (a n g i o p o i e t i n) と直接的または間接的に結合させるように使用され得、そして血管新生化腫瘍内の壊死悪性細胞にアンギオポエチンを投与するように使用され得る。

## 【0205】

米国特許第5, 019, 368号、同第4, 861, 581号、および同第5, 882, 626号（各々、本明細書中で参考として援用される）においても開示されるように、これらの抗体は、組合せ診断方法（以下を参照のこと）および抗腫瘍治療の有効性を測定するための方法において使用され得る。このような方法は、一般的に、標識化バージョンの抗体の調製および投与、ならびに壊死組織内に優先的に結合された内部細胞性成分標的への標識化抗体の結合を測定することを包含する。それによって、この方法は、壊死組織を画像化する。ここで、局在化した抗体濃度は、腫瘍の存在の指標であり、そして抗腫瘍治療によって殺傷された細胞のゴーストを示す。

## 【0206】

抗腫瘍支質イムノトキシンまたはコアグリガンドは、フィブリン、R I B SまたはL I B Sへの結合により例証されるように、一般的に、結合組織成分、基底膜成分、または活性化血小板成分に結合する抗体を含む。

## 【0207】

抗腫瘍脈管構造のイムノトキシンまたはコアグリガンドは、血管新生化腫瘍の血液輸送血管（好ましくは腫瘍内血管）の表面発現成分、表面アクセス可能成分

、または表面局在化成分に結合するリガンド、抗体またはそれらのフラグメントを含み得る。このような抗体は、血管新生化腫瘍の腫瘍内血管の表面発現成分に結合する抗体を含む。これには、以下が挙げられる：腫瘍内脈管構造細胞表面レセプター（例えば、エンドグリン（TEC-4抗体およびTEC-11抗体））、TGF $\beta$ レセプター、E-セ렉チン、P-セ렉チン、VCAM-1、ICAM-1、PSMA、VEGF/VPFレセプター、FGFレセプター、TIE、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリン、プレイオトロピン、エンドシアリンならびにMHCクラスIIタンパク質。この抗体はまた、腫瘍内血管のサイトカイン誘導性成分または凝血剤誘導性成分に結合し得る。特定の好ましい薬剤は、アミノリン脂質（例えば、ホスファチジルセリンまたはホスファチジリエタノールアミン）に結合する。

#### 【0208】

他の抗腫瘍脈管構造イムノトキシンまたはコアグリガンドは、腫瘍内脈管構造細胞表面レセプターに結合するリガンドまたは増殖因子に結合する抗体またはそれらのフラグメントを含み得る。このような抗体は、VEGF/VPF（GV39およびGV97抗体）、FGF、TGF $\beta$ 、TIEに結合するリガンド、腫瘍関連フィブロネクチンアイソフォーム、散乱因子/肝細胞増殖因子（HGF）、血小板因子4（PF4）、PDGFおよびTIMPと結合する抗体を含む。これらの抗体またはそれらのフラグメントはまた、リガンド：レセプター複合体または増殖因子：レセプター複合体に結合し得るが、リガンドもしくは増殖因子またはレセプターがリガンド：レセプター複合体または増殖因子：レセプター複合体中にない場合、リガンドにも増殖因子にもレセプターにも結合し得ない。

#### 【0209】

抗腫瘍細胞、抗腫瘍支質または抗腫瘍脈管構造抗体-治療剤構築物は、植物由来毒素、真菌由来毒素、または細菌由来毒素のような抗脈管形成剤、アポトーシス誘発剤、抗チューブリン薬、細胞傷害性薬剤を含み得る。リシンA鎖および脱グリコシル化リシンA鎖が、しばしば好ましい。抗腫瘍細胞、抗腫瘍支質または抗腫瘍脈管構造抗体-治療剤構築物は、凝血剤（直接的または間接的に作用する凝固因子）に結合する凝固因子または第2の抗体結合領域（凝固因子に結合する

）を含み得る。組織因子または組織因子誘導体（例えば、短縮された組織因子）との作動可能な結合が、しばしば好ましい。

#### 【0210】

本発明の組成物、キット、および／または医薬に関して、治療剤の併用有効量は、単一の容器もしくは容器手段内に含まれても、または異なる容器もしくは容器手段内に含まれてもよい。反応混液は、一般的に、併用使用のために共に混合される。静脈内投与のために処方される薬剤が、しばしば好ましい。画像化成分もまた、含まれ得る。キットはまた、少なくとも第1の抗体、および1以上の他に含まれる生物学的薬剤の使用に関する指示書を備え得る。

#### 【0211】

該して、少なくとも第2の抗癌剤は、VEGFR2-遮断（VEGFR2-blocking）、抗VEGF抗体または2C3ベースの治療剤と実質的に同時に、動物または患者に投与され得る（例えば、単一の薬学的組成物から、または密接して一緒に投与される2つの薬学的組成物から）。

#### 【0212】

あるいは、少なくとも第2の抗癌剤は、VEGFR2-遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの治療剤の投与に対して逐次的な時間に、動物または患者に投与され得る。「逐次的な時間」は、本明細書中で使用される場合、「時差的（stagged）」を意味し、その結果、少なくとも第2の抗癌剤は、VEGFR2-遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの治療剤の投与と異なる時点で、動物または患者に投与される。一般的に2つの薬剤は、その2つの薬剤が、それらの個々の治療効果を発揮するのを可能にするに有効な時間間隔を隔てた時点で投与される（すなわち、2つの薬剤は、「生物学的に有効な時間間隔」で投与される）。少なくとも第2の抗癌剤は、VEGFR2-遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの治療剤の前に、生物学的に有効な時間に動物または患者に投与され得るか、あるいは、それらの治療剤に対して逐次的に、生物学的に有効な時間に動物または患者に投与され得る。

#### 【0213】

従って、本発明は、血管新生化腫瘍を有する動物または患者を処置するための

方法を提供し、この方法は、以下を包含する：

(a) 腫瘍負荷量を実質的に減少させる第1の処置に、動物または患者を供する工程；および

(b) 引き続いて、任意の残存する腫瘍細胞からの転移を阻害するに有効な量で、少なくとも第1の抗脈管形成剤を、この動物または患者に投与する工程であって；ここで、この第1の抗脈管形成剤は、少なくとも第1のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体またはその抗原結合フラグメントであるか、必要に応じて、モノクローナル抗体2C3 (ATCC PTA 1595) と実質的に同じエピトープに結合するものであり；必要に応じて、この抗体またはフラグメントは、第2の抗脈管形成剤と作動可能に連結される、工程。

【0214】

好ましい第1の処置としては、外科的切除および化学療法介入が挙げられる。併用される抗脈管形成剤（例えば、アングリオポエチン2または腫瘍標的化アングリオポエチン2構築物）もまた使用され得る。

【0215】

血管新生化腫瘍を有する動物または患者についての他の処置方法は、以下を包含する：

(a) 実質的に腫瘍壊死を誘導するに有効な量で、第1の抗体-治療剤構築物を、動物または患者に投与する工程であって；ここで、この第1の抗体-治療剤構築物は、腫瘍細胞、腫瘍脈管構造または腫瘍支質の表面発現成分、表面アクセス可能成分、または表面局在化成分に結合する第1の抗体またはその抗原結合フラグメントに作動可能に連結された治療剤を含む、工程；および

(b) 引き続いて、任意の残存する腫瘍細胞からの転移を阻害するに有効な量で、第2の抗体を、この動物または患者に投与する工程であって；ここで、この第2の抗体は、少なくとも第1のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体またはその抗原結合フラグメントであるか、必要に応じて、モノクローナル抗体2C3 (ATCC PTA 1595) と実質的に同じエピトープに結合するものであり；そしてさらに必要に応じて、この抗体またはフラグメントは、第2の抗脈管形成剤と作動可能に連結される、工程。

## 【0216】

特に好ましい実施形態では、本発明は、プロドラッグおよびA D E P Tと組合せての使用のための、V E G F R 2-遮断抗V E G F抗体および2 C 3ベースの抗体を提供する。このような組成物、配合物（c o m b i n a t i o n）、医薬品、キット、方法および使用において、V E G F R 2-遮断抗V E G F抗体もしくは2 C 3ベースの抗体またはそれらのフラグメントは、変換能力または酵素学的能力を提供するように改変されるか、または少なくとも1つのプロドラッグをその薬物の活性形態に変換し得る少なくとも第1の変換剤または酵素に作動可能に連結（好ましくは、共有結合または結合体化）される。

## 【0217】

酵素的または酵素に結合体化された抗体またはフラグメントは、「プロドラッグ」の最初の別個の処方物と組合せられる。プロドラッグは、不活性または弱い活性の形態の薬物であり、これは、V E G F R 2-遮断抗V E G F抗体または2 C 3抗体に付随した酵素的能力、変換機能または酵素との接触に際して、活性形態の薬物に変換される。

## 【0218】

従って、好ましくは別個の組成物および／または容器中に、以下を含むキットが提供される：

（a）生物学的有効量の少なくとも第1のV E G F R 2-遮断抗V E G F抗体もしくは2 C 3ベースの抗体、またはそれらのフラグメントであって、これらは酵素学的機能を有し、好ましくはここで、この抗体またはフラグメントは、少なくとも第1の酵素と作動可能に連結されるか、共有結合されるか、または結合体化される、生物学的有効量の少なくとも第1の第1のV E G F R 2-遮断抗V E G F抗体もしくは2 C 3ベースの抗体、またはそれらのフラグメント；および

（b）生物学的有効量の少なくとも第1の実質的に不活性なプロドラッグであって、V E G F R 2-遮断抗V E G F抗体もしくは2 C 3抗体、またはフラグメントの酵素学的機能、またはそれらに結合されるか、連結されるか、もしくは結合体化された酵素によって、実質的に活性な薬物に変換される、生物学的有効量の少なくとも第1の実質的に不活性なプロドラッグ。

## 【0219】

本発明はさらに、以下を包含する、有利な方法および使用を提供する：

(a) 少なくとも第1のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体もしくは2C3ベースの抗体、またはそれらの抗原結合フラグメントを含む、生物学的有効量の少なくとも第1の薬学的組成物を、血管新生化腫瘍を有する動物または患者に投与する工程であって、ここで、この抗体またはフラグメントは、酵素学的機能を有し、好ましくはここで、この抗体またはフラグメントは、少なくとも第1の酵素と作動可能に連結されるか、共有結合されるか、または結合体化され；ここで、この抗体またはフラグメントは、投与後に、血管新生化腫瘍の脈管構造、腫瘍内脈管構造、または支質に局在化する、工程；および

(b) 引き続いて、有効な期間後に、生物学的有効量の少なくとも1つの実質的に不活性なプロドラッグを含む、生物学的有効量の少なくとも第2の薬学的組成物を、動物または患者に投与する工程であって；ここで、このプロドラッグは、この血管新生化腫瘍の脈管構造、腫瘍内脈管構造、または支質内に局在化されたVEGFR2-遮断抗VEGF抗体もしくは2C3抗体、またはフラグメントの酵素学的機能、またはそれらに連結されるか、結合されるか、または結合体化された酵素によって、実質的に活性な薬物に変換される、工程。

## 【0220】

特定の他の実施形態では、本発明の抗体および免疫結合体は、1以上の診断剤、代表的に、新脈管形成性疾患に関連した使用のための診断剤と組合せられ得る。従って、一定範囲の診断用組成物、キット、および方法が、本発明に包含される。

## 【0221】

癌の診断および処置に関して、本発明の診断用および画像化用の組成物、キットおよび方法は、インビボおよびインビトロでの診断を包含する。例えば、血管新生化腫瘍は、診断的に有効な量の腫瘍診断成分（これは、インビボでの診断用画像化剤に作動可能に結合された、腫瘍細胞、腫瘍脈管構造、または腫瘍支質のアクセス可能な成分に結合する少なくとも第1の結合領域を含む）を使用して、画像化され得る。



## 【0222】

腫瘍画像化は、好ましくは、腫瘍脈管構造または腫瘍支質のアクセス可能な成分に結合する少なくとも第1の結合領域を含む診断成分を使用して、血管新生化腫瘍の支質および／または脈管構造の画像を提供するように実施される。任意の適切な結合領域または抗体（例えば、治療用構築物に関して上記されたもの）が、使用され得る。検出可能に標識されたVEGFR2-遮断抗VEGF抗体もしくは2C3ベースの抗体構築物を使用することによって、特定の利点が提供され、ここで、形成される画像は、使用される治療剤の結合部位に予言的である。

## 【0223】

検出可能に標識されたインビボ腫瘍診断剤（VEGFR2-遮断抗VEGF抗体もしくは2C3ベースの抗体であっても、そうでなくても良い）は、以下を含み得る：X線検出可能化合物（例えば、ビスマス（III）、金（III）、ランタン（III）、または鉛（II））；放射性イオン（例えば、銅<sup>67</sup>、ガリウム<sup>67</sup>、ガリウム<sup>68</sup>、インジウム<sup>111</sup>、インジウム<sup>113</sup>、ヨウ素<sup>123</sup>、ヨウ素<sup>125</sup>、ヨウ素<sup>131</sup>、水銀<sup>197</sup>、水銀<sup>203</sup>、レニウム<sup>186</sup>、レニウム<sup>188</sup>、ルビジウム<sup>97</sup>、ルビジウム<sup>103</sup>、テクネチウム<sup>99m</sup>、またはイットリウム<sup>90</sup>）；核磁気スピン共鳴同位体（例えば、コバルト（II）、銅（II）、クロム（III）、ジスプロシウム（III）、エルビウム（III）、ガドリニウム（III）、ホルミウム（III）、鉄（II）、鉄（III）、マンガン（II）、ネオジム（III）、ニッケル（II）、サマリウム（III）、テルビウム（III）、バナジウム（II）、またはイッテルビウム（III））；あるいはローダミンまたはフルオレセイン。

## 【0224】

腫瘍処置の前の前画像化は、以下によって実施され得る：

（a）腫瘍細胞、腫瘍脈管構造（好適）または腫瘍支質（好適）のアクセス可能な成分に結合する少なくとも第1の結合領域に作動可能に連結された診断剤（VEGFR2-遮断抗VEGF抗体もしくは2C3ベースの抗体構築物に作動可能に連結された診断剤）を含む、診断的に有効な量の薬学的組成物を、動物または患者に投与する工程；および

(b) 引き続いて、腫瘍細胞、腫瘍血管（好適）または腫瘍支質（好適）に結合された、検出可能に標識された第1の結合領域（すなわち、VEGFR2-遮断抗VEGF抗体もしくは2C3ベースの抗体）を検出する工程であって；これによって、腫瘍、腫瘍脈管構造および／または腫瘍支質の画像を得る、工程。

#### 【0225】

癌の処置はまた、以下によって実施され得る：

(a) 腫瘍結合剤、またはVEGFR2-遮断抗VEGF抗体もしくは2C3ベースの抗体に作動可能に連結された診断剤を含む、診断的に最少の量の少なくとも第1の検出可能に標識された腫瘍結合剤（好ましくは、VEGFR2-遮断抗VEGF抗体もしくは2C3ベースの抗体構築物）を、血管新生化腫瘍を有する動物または患者に投与し、それによって腫瘍、腫瘍脈管構造（好適）、または腫瘍支質（好適）の検出可能な画像を形成することによって、血管新生化腫瘍の画像を形成する工程；および

(b) 引き続いて、少なくとも第1の裸のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体もしくは2C3抗体または治療剤-抗体構築物の治療的に最適な量を、このような抗体を使用して、同じ動物または患者に投与し、それによって抗腫瘍効果をもたらす工程。

#### 【0226】

従って、画像化および処置の処方物または医薬が提供され、これは一般的に、以下を含む：

(a) 診断的に有効な量の検出可能に標識された腫瘍結合剤（好ましくは、VEGFR2-遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体構築物）を含む第1の薬学的組成物であって、腫瘍結合剤またはVEGFR2-遮断、抗VEGF抗体もしくは2C3ベースの抗体に作動可能に連結された、検出可能な薬剤を含む、第1の薬学的組成物；および

(b) 治療的有效量の少なくとも1つの裸のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体もしくは2C3抗体、またはこのような抗体を用いた治療剤-抗体構築物を含む、第2の薬学的組成物。

#### 【0227】

本発明はまた、生物学的有効量の少なくとも1つの診断剤を含む、少なくとも1つの第一の組成物または薬学的組成物を含むインビトロの診断キットを提供し、診断剤は、少なくとも第一のVEGFR2遮断抗VEGF抗体、必要に応じて、モノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と実質的に同じエピトープに結合するもの、またはその抗原結合フラグメントと作動可能に連結される。

#### 【0228】

本発明はなおさらに、診断剤が、その本体の外、好ましくは動物または患者から得られる生物学的サンプルにおいて行われる試験と関連した使用のために意図される、組み合わされたキットを提供する。それとして、本発明は、一般的に少なくとも二つの異なる容器において、少なくとも第一の組成物、薬学的組成物または医薬カクテル(medicinal cocktail)を含み、これらは、生物学的有効量の少なくとも第一のVEGFR2遮断、抗VEGF抗体、必要に応じて、モノクローナル抗体2C3(ATCC PTA 1595)と実質的に同じエピトープに結合するもの、またはこのような抗VEGF抗体の抗原結合フラグメントまたは免疫結合体；およびインビトロの使用のために、生物学的有効量の少なくとも一つの診断薬剤、成分または系を含む)、キットを提供する。

#### 【0229】

「インビトロでの使用のための診断剤、成分または系」は、脈管形成の要素を有する1つ以上の疾患の診断を可能にする、任意の診断剤または薬剤の組み合わせである。従って、インビトロでの診断は、以下のいずれか1つで開示されるような疾患または障害に関連した診断または予後の情報の作成において使用するのに適切な診断を含む：米国特許第5,712,291号、同第5,753,230号、同第5,972,922号、同第5,639,757号、WO 98/45331およびWO 98/16551(各々が詳細に、参考として本明細書中に援用される)。

#### 【0230】

癌診断および処置の点で、インビトロでの診断薬は、腫瘍細胞、腫瘍脈管構造(好ましくは)または腫瘍支質(好ましくは)の接近可能な成分に結合する、少

なくとも第一の結合領域を含む診断成分（これは、インビトロ診断試験により直接的にまたは間接的に検出可能な「検出可能な因子またはレポーター因子」に作動可能に結合される）を好ましくは含む。インビトロで直接的に検出可能な「検出可能な因子またはレポーター因子」は、免疫蛍光検査により検出可能な、放射性標識およびレポーター薬剤のような因子を含む。

### 【0231】

インビトロで間接的に検出可能な「検出可能な因子またはレポーター因子」は、さらなる内因性因子と共に機能する因子（例えば、色素基質と接触して、着色産物を生成する検出可能な酵素）を含む。インビトロでの間接的な検出はまた、検出可能な成分またはレポーター成分あるい系に及ぶ。これらは、第一の結合領域に免疫特異性を有する少なくとも1つの検出抗体と組み合わせて、腫瘍細胞、腫瘍脈管構造（好ましくは）または腫瘍支質（好ましくは）のアクセス可能な成分に結合する第一の結合領域を含む。「検出抗体」は、好ましくは、直接的または間接的に検出可能な因子（例えば、放射性標識または酵素）に結合する「2次抗体」である。あるいは、「2次および3次抗体検出系」が使用され得、この系は、1次検出抗体に対して免疫特異性を有する2次検出抗体と組み合わせて、第一の結合領域に対する免疫特異性を有する1次検出抗体を含み、この2次検出抗体は、直接的または間接的に検出可能な因子に結合される。

### 【0232】

（例示的实施形態の説明）

固形腫瘍および癌腫は、人類における全ての癌の90%以上の割合を占める。モノクローナル抗体およびイムノトキシンの使用はリンパ腫および白血病の治療において検討されてきたが、これらの薬剤は、癌腫および他の固形腫瘍に対する臨床試験では、期待に反して効果がなかった（AbramおよびOldham、1985）。抗体を基礎とする処置が効果が不十分であることの主な理由は、高分子が容易に固形腫瘍に輸送されないことである。腫瘍塊内に一旦はいても、これらの分子は、腫瘍細胞間の固い結合、線維性支質、間質の圧勾配、および結合部位障壁の存在に起因して均一に分布され得ない（Dvorakら、1991）。

## 【0233】

固形腫瘍を処置するための新しい戦略の開発において、腫瘍細胞よりもむしろ腫瘍の血管の標的化を含む方法が明白な利点を提供する。腫瘍血管の効果的な破壊またはブロックは、腫瘍を通じる血流を停止させ、そして腫瘍細胞死の殺到を生じる。抗体-トキシンおよび抗体-凝集素構築物は、特異的な標的化および腫瘍血管の破壊にすでに有効に用いられ、腫瘍壊死を生じる（Burrowsら、1992；BurrowsおよびThorpe、1993；WO93/17715；WO96/01653；米国特許第5,855,866号；同第5,877,289号；同第5,965,132号；同第6,051,230号；同第6,004,555号；米国特許出願第08/482,369号（1998年10月20日に発行料金支払い済み）；それぞれ、本明細書において参考として援用される）。

## 【0234】

抗体、増殖因子または他の結合リガンドが腫瘍血管へ凝固剤を特異的に送達するために用いられる場合、このような薬剤は、「コアグリガンド（coaguli-gands）」と名付けられる。現在、コアグリガンドに用いるのに好ましい凝固剤は、短縮化組織因子（truncated Tissue Factor（tTF）である（Huangら、1997；WO96/01653；米国特許5,877,289号）。TFは、血液凝固の主要な開始因子（initiator：イニシエーター）である（Rufら、1991）。損傷の部位では、血液中の第VII/VIIa因子は、脈管周囲組織における細胞の上のTFに接触し、そして結合する。TF：VIIa複合体は、リン脂質表面の存在下において、第IX因子および第X因子を活性化する。次に、これは、トロンビンおよびフィブリンの形成、そして最終的に血餅の形成を導く（RufおよびEdgington、1994）。

## 【0235】

腫瘍内皮で利用可能である（しかし、正常な内皮には大きく欠乏している）適切な標的分子の範囲は、記載されている。例えば、以下のような、発現された標的が、利用され得る：エンドグリン、Eセレクトイン、Pセレクトイン、VCAM-

1、ICAM-1、PSMA、TIE、LAM-1と反応性のリガンド、VEGF/VPDFレセプター、FGFレセプター、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリン、プレイトロピンまたはエンドシアリン（米国特許5,855,866号、同第5,877,289号および同第6,004,555号；Burrowsら、1992；BurrowsおよびThorpe, 1993；Huangら、1997；それぞれは、本明細書において参考として援用される）。

#### 【0236】

天然の腫瘍環境またはヒトによる以下の介入により誘導可能な他の標的はまた、標的可能な存在である。これは米国特許第5,776,427号、および同第6,036,955号；それぞれは本明細書に参考として援用されている）に記載されている。正常組織における事前の抑制および腫瘍血管誘導と組み合わせて用いた場合、MHCクラスII抗原はまた、標的として使用され得る（米国特許第5,776,427号；同第6,004,554号および同第6,036,955号；それぞれは、本明細書において参考として援用される）。

#### 【0237】

吸着された標的は、VEGF、FGF、TGF $\beta$ 、HGF、PF4、PDGF、TIMP、TIEに結合するリガンド、または腫瘍関連フィブロネクチンアイソフォームのような別の適切なグループである（米国特許第5,877,289号、および同第5,965,132号；それぞれは、本明細書において参考として援用される）。フィブロネクチンのアイソフォームは、レセプターのインテグリンファミリーに結合するリガンドである。腫瘍関連フィブロネクチンアイソフォームは、腫瘍血管および腫瘍支質の両方の標的化可能な成分である。

#### 【0238】

このような臨床的標的化適用のための1つの現在好まれるマーカーは、レセプター関連VEGFである。実際、VEGFの集合：レセプター複合体は、現在までに観察される腫瘍脈管構造の最も特異的なマーカーの1つである（米国特許第5,877,289号；同第5,965,132号および同第6,051,230号；Lin-Keら、1996；Dvorakら、1991b）。

#### 【0239】

VEGF：レセプター複合体は、腫瘍内皮に対する薬物または他のエフェクターの特異的な送達のための、魅力的な標的を提示する。――なぜなら、腫瘍は、サイトカインおよび増殖因子で富化され、そしてなぜなら、VEGFレセプターは、ほとんどの固形腫瘍において見出される低酸素状態でアップレギュレートされるからである（Mazureら、1996；Forsytheら、1996；Waltenbergerら、1996；Gerberら、1997；Kremerら、1997）。腫瘍の微小環境に特異的なリガンドおよびそのレセプターの両方のアップレギュレートは、正常組織における上皮と比較して、腫瘍血管内皮において高濃度で占められたレセプターに導く（米国特許第5,877,289号および同第5,965,132号）。Dvorakおよび仲間はまた、VEGFのN末端に対して指向されたウサギポリクローナル抗体が、マウス保有（bearing）同系腫瘍に注射後、選択的に腫瘍血管を染色する（Lin-Keeら、1996）。

#### 【0240】

臨床的介入に対する標的としてのVEGFの役割は、免疫毒素またはコアグリガンド治療に限られない。実際、VEGFは、固形腫瘍の新脈管形成に関与する鍵となる因子の1つであり（Ferrara、1995；Potgensら、1995）、強力な透過性因子（Sengerら、1983；Sengerら、1990；Sengerら、1986）および内皮細胞マイトジェン（Keckら、1989；Connollyら、1989；Thomas、1996）である。VEGFと新脈管形成との間の関連は、VEGF介入の目的とされる種々の治療的ストラテジーの提案に導いた（Siemeisterら、1998）。

#### 【0241】

##### （A. VEGFおよびVEGFレセプター）

血管内皮増殖因子（VEGF）は、低酸素および腫瘍変異によりにより誘導される多機能性サイトカインである。VEGFは、胚発生における血管ネットワークの発生および維持の初期の刺激薬である。これは、強力な透過性誘導因子、内皮細胞走化性因子、内皮生存因子、および内皮細胞増殖因子である（Thomas、1996；Neufeldら、1999）。この活性は、正常胚発生に必要な

とされる (Fongら、1995; Shalabyら、1995)。なぜなら、VEGFの1つまたは両方の対立遺伝子の標的化された破壊は、胚性致死を生じるからである (Carmelietら、1996; Ferraraら、1996)。

#### 【0242】

VEGFは、多数の生理学的小および病理学的プロセスにおいて新脈管形成または脈管形成を駆動する重要な因子であり、創傷治癒 (Frankら、1995; Burkeら、1995)、糖尿病性網膜症 (Alon、1995; Malecaze、1994)、乾癬 (Detmarら、1994)、アテローム性動脈硬化症 (Inoueら、1998)、慢性関節リウマチ (Haradaら、1998; Nagashimaら、1999)、固形腫瘍増殖 (Plateら、1994; Claffeyら1996)を含む。

#### 【0243】

広範な種々の細胞および組織は、VEGFを産生し、VEGFは、同じ遺伝子によりコードされるスプライス改変体である、少なくとも5つのアイソフォーム (121、145、165、189および206アミノ酸) に存在する (Houckら、1991; Ferraraら、1991; Tischerら、1991)。2つのより小さいアイソフォーム (121および165) は、細胞から分泌される (Houckら、1991; Anthonyら、1994)。分泌されるVEGFは、モノマーが2つのジスルフィド結合により結合される38~46 kDaとの間の偏性 (obligate) ダイマーである。

#### 【0244】

VEGFダイマーは、高い親和性で2つの十分に特徴化されたレセプター (VEGFR1 (FLT-1) およびVEGFR2 (KDR/Flk-1)) に結合し、これらのレセプターは内皮細胞で選択的に発現される (Flt-1およびFlk-1は、マウスの相同体である)。VEGFR1およびVEGFR2に対するVEGF結合の $K_d$ は、それぞれ、15~100 pMおよび400~800 pMである (Terman 1994)。最近同定された第3細胞表面タンパク質 (ニューロピリン-1 (neuropilin-1)) はまた、高い親和性によ



りVEGFに結合する(Olanderら、1991; DeVriesら、1992; Termanら、1992; Sokerら、1998)。

#### 【0245】

VEGFR1およびVEGFR2は、III型レセプターチロシンキナーゼ(RTK III)ファミリーのメンバーであり、このファミリーは、7つの細胞外IgG様リピート、単一の架橋(spanning)膜貫通ドメイン、および細胞内スプリット(split)チロシンキナーゼドメインにより特徴付けられる(MustonenおよびAlitalo、1995)。非常に最近まで、VEGFR1およびVEGFR2が、内皮細胞においてほとんど独占的に発現されていると考えられていた(MustonenおよびAlitalo、1995)。VEGFR1およびVEGFR2が、内皮細胞増殖、移動、および分化を刺激することに関して異なる機能を有すると報告されているが(Waltenbergerら、1994; Guoら、1995)、各レセプターがVEGF生物学および内皮細胞ホメオスタシスにおいて果たす正確な役割は、本発明の以前には明確に規定されていなかった。

#### 【0246】

ノックアウトマウスを用いた最近の研究は、VEGF、VEGFR1およびVEGFR2の各々が脈管形成、新脈管形成および胚発生に不可欠であることを示した(Fongら、1995; Shalabyら、1995; Hiratsukaraら、1998)。致死ノックアウトの研究において、各レセプターの欠損に関連した表現型は、異なった。VEGFR2の標的化された破壊は、内皮細胞分化に欠陥があり、そして卵黄囊の血糖を形成できないか、または脈管形成を終えることができない胚を生じる(Shalabyら、1995)。VEGFR1ヌル変異体は、脈管形成障害、内皮細胞の乱された集合、および血管の拡張を示す(Fongら、1995; Hiratsukaraら、1998)。VEGFR1は、明らかにきわめて重要な生物学的役割を有する。

#### 【0247】

VEGFR1は、より低いチロシンキナーゼ活性を有するが、VEGFR1は、VEGFR2よりVEGFに対してより高い親和性を有する。これは、VEG

FR1の細胞外ドメインが、特に重要であることを示唆する。この仮説は、インタクトなVEGF結合ドメインを残す一方、VEGFR1のチロシンキナーゼドメインが欠失されたノックアウトマウスにおける研究からの結果により強く示唆された(Hiratsukara, 1998)。VEGFR1-チロシンキナーゼ欠陥胚は、正常な血管を発生し、そして限定された期間まで生存した(Hiratsukara, 1998)。

#### 【0248】

初期ノックアウト(Fongら, 1995; Shalabyら, 1995)に加えて、Hiratsukara(1998)の研究は、VEGFR1が重要な生物学的役割を有することを示す。しかし、チロシンキナーゼシグナルは、決定的な因子ではないようである。VEGFR1ノックアウトマウス由来のマクロファージは、VEGF誘導走化性を示さず(Hiratsukara, 1998; 参考として本明細書中で援用される)、それにより、VEGFに対するこの重要な生物学的応答を媒介するのに関わるレセプターとしてVEGFR1が関係することを示したことは興味深い。

#### 【0249】

あるグループが、VEGF誘導有糸分裂、および透過性における優性シグナルレセプターである、VEGFR2を報告した(Waltenbergerら, 1994; Zachary, 1998; KorpelainenおよびAlitalo, 1998)。マクロファージ移動および走化性における機能が、上記のHiratsukara(1998)の研究において立証されているが、内皮細胞機能におけるVEGFR1の役割は、ほとんど明らかではない。

#### 【0250】

Claussら(1996; 本明細書中で参考として援用される)はまた、VEGFR1が、単球活性および走化性において重要な役割を有することを報告した。実際、マクロファージ/単球システムの細胞は、VEGFR1のみを発現し、このレセプターは、単球補充およびプロコアギュラント活性を媒介するのに関係するレセプターである(Claussら, 1996)。単球およびマクロファージにおけるVEGFR1に対するVEGF結合はまた、細胞内カルシウムを惹起し

、そしてチロシンリン酸化を誘導することにより作用する（C l a u s s ら、1996）。

#### 【0251】

VEGFレセプターに対するVEGFダイマーの結合は、レセプター二量体化を誘導すると考えられる。次いで、レセプターの二量体化は、それぞれ、VEGFR2およびVEGFR1の細胞内側における、特異的なチロシン残基（Y801およびY1175、ならびにY1213およびY1333）の自己リン酸基転移を引き起こす。これは、シグナルトランスダクションカスケードに導き、このカスケードは、ホスホリパーゼC $\gamma$ （PLC $\gamma$ ）およびホスファチジルイノシトール3-キナーゼ（PI3K）の活性ならびに細胞内カルシウムイオンの増大を含む（HoodおよびMeininger、1998；Hoodら、1998；KrollおよびWaltenberger、1998）。

#### 【0252】

多くのグループが、一酸化窒素（NO）がVEGFR2のVEGF活性後に産生されることを示しているが、VEGF誘導シグナルにおけるさらに下流の細胞内事象は、あまり明らかではない（HoodおよびMeininger、1998；Hoodら、1998；KrollおよびWaltenberger、1998）。VEGFR1ではなくVEGFR2の活性が、VEGFにより、SrcおよびRas-MAPキナーゼカスケード（MAPキナーゼ、ERK1およびERK2を含む）を活性化することもまた示された（Waltenbergerら、1994、1996；KrollおよびWaltenberger、1997）。

#### 【0253】

特に、Flt-1チロシンキナーゼ欠陥マウスが、生存可能であり、そして正常な管を発生するように、内皮細胞機能におけるVEGFR1の役割は、ほとんど明らかではない（Hiratsukaら、1998）。内皮におけるVEGFR1の主な生物学的役割が、非シグナルリガンド結合分子、またはVEGFR2に対してVEGFを提示するのに必要とされ得る、「おとり」レセプターとしての役割であることが示唆されている。

## 【0254】

VEGFと病理学的脈管形成状態との間の関連が、VEGF活性をブロックする種々の試みを促している。これらは、VEGFに対する特定の中和抗体の発生を含む（Kimら、1992；Prestaら、1997；Sioussatら、1993；Kondoら、1993；Asanoら、1995）。VEGFレセプターに対する抗体もまた、記載されている（例えば、米国特許第5,840,301号および同第5,874,542号、ならびに、本発明に引き続いて、WO 99/40118において記載される）。米国特許第5,840,301号および同第5,874,542号が、実際、VEGF自体ではなく、VEGFレセプターをブロックすることが、種々の理由のために都合が良いことを示唆している。

## 【0255】

可溶性レセプター構築物（KendallおよびThomas、1993；Aielloら、1995；Linら、1998；Millaunerら、1996）、チロシンキナーゼインヒビター（Siemeisterら、1998）、アンチセンスストラテジー、RNAアプタマーおよびVEGFまたはVEGFレセプターに対するリボザイムもまた、報告されている（Salehら、1996；Chengら、1996；Keら、1998；Parryら、1999；各々が参考として本明細書中に援用される）。

## 【0256】

（B. 抗VEGF抗体）

（B1. 抗体特性の範囲）

種々の阻害方法の応用は、VEGFシグナル伝達を妨害することにより、新脈管形成のブロッキングおよび／または腫瘍増殖の抑制のいずれかにおいて少なくともいくらか効果的であると示されている。実際に、VEGFに対するモノクローナル抗体は、マウスにおけるヒト腫瘍異種移植片増殖、および腹水形成を阻害すると示されている（Kimら、1993；Asanoら、1995；1998；Mesianoら、1998；Luoら、1998a；1998b；Borgstromら、1996；1998）。

## 【0257】

抗体A4.6.1は、VEGFR1およびVEGFR2の両方に対するVEGFの結合をブロックし得る、高親和性の抗VEGF抗体である（Kimら、1992；Wiesmannら、1997；Mullerら、1998）。A4.6.1のFabフラグメントにより結合されたVEGFの、アラニン走査突然変異誘発およびX線結晶学は、A4.6.1が結合するVEGFのエピトープがアミノ酸89～94のあたりに中心を有することを示した。この構造的データは、A4.6.1が、最もありそうには立体障害により、VEGFがVEGFR2に結合することを完全に阻害するが、VEGFがVEGFR1に結合することを阻害することを実証する（Mullerら、1998；Keytら、1996；各々が、本明細書中に参考として援用される）。

## 【0258】

A4.6.1は、現在まで文献において最も広範囲に利用されている、中和抗VEGF抗体である。これは、マウスにおける種々のヒト腫瘍の増殖およびVEGF誘導血管透過性を阻害することが示されている（Brem、1998；Baccaら、1997；Prestaら、1997；Mordentiら、1999；Borgstromら、1999；Ryanら、1999；Linら、1999；各々が、具体的に本明細書中に参考として援用される）。A4.6.1はまた、十分に特徴付けられたヒト卵巣癌マウスモデルにおける腹水形成、および新規な転移マウスモデルにおける腫瘍播種を阻害する。A4.6.1は、一価ファージディスプレイ技術により最近ヒト化され、そして現在は、抗癌剤としての第I段階の臨床試行中である（Brem、1998；Baccaら、1997；Prestaら、1997；各々が、本明細書中に参考として援用される）。

## 【0259】

VEGFに対する中和抗体を用いた当該分野におけるいくつかの成功にもかかわらず、本発明者らは、新たな抗体（特に、VEGFR1（FTL-1）および／またはVEGFR2（KDR／Flk-1）との相互作用の、より正確に規定された様式を有するもの）が、種々の理由から有利であることを理解した。例えば、2つのVEGFレセプターのうちの一方のみとのVEGFの相互作用を選択

的にブロックする、抗VEGF抗体の開発は、VEGFR1およびVEGFR2の両方を発現する細胞におけるVEGFにより活性化される経路の、より正確な分析を、可能にする。

#### 【0260】

本発明者らは、1つのレセプター（VEGFR2）のみに結合するVEGFをブロックした、規定されたエピトープ特異性の抗体が、同様に、臨床的利点を、もちろん、これらのインビボでの環境内での阻害効果の維持に依存して、有し得ると考えた。Hiratsukaら（1998）のノックアウトマウスでの試験は、VEGFR1およびVEGFR2の両方が、重要な生物学的役割を有することを示す。本発明の前に、2つのレセプターのうちの一方のみにより、VEGFにより媒介される効果を阻害することに関する、治療的調査のための現実的な機会は、効果的なあつらえの阻害的薬剤の欠乏により、妨害された。

#### 【0261】

本発明者らは、最初に、種々のエピトープ特異性および特性を有する、ある範囲の新たな抗VEGF抗体を開発した。VEGF：レセプター（Flk-1）複合体またはVEGF自体に対するモノクローナル抗体を分泌する、6群のハイブリドーマを提供する。抗体群のうちの5つはVEGFのそのレセプターへの結合を妨害しないが、1つは、この相互作用をブロックし（2C3群）、そして内皮細胞のVEGFにより媒介される増殖を、阻害した。

#### 【0262】

3E7、GV39M、および2C3の群の抗体（これらは全て、ヒト腫瘍異種移植片を有するマウスに静脈内注射した後に、腫瘍に選択的に局在化する）は、現在、固形腫瘍の脈管構造または結合組織の標的化、画像化および処置において使用するために、好ましい。

#### 【0263】

VEGF：レセプター複合体を認識する本発明のモノクローナル抗体は、ヒト腫瘍異種移植片を有するマウスに注射した後に、腫瘍内皮細胞へと選択的に局在化する。2C3群のモノクローナル抗体は、腫瘍の脈管周囲の結合組織、および周囲の腫瘍脈管にも、著しく局在化する。

## 【0264】

N末端を認識する抗体は、ELISAにより、レセプター結合VEGFと反応する。GV39Mおよび11B5は、非レセプター結合VEGFとは対照的に、レセプター結合VEGFに対する高い特異性を示す。恐らく、N末端上のGV39Mおよび11B5により認識されるエピトープは、構造的であり、そしてVEGFがそのレセプターに結合する場合に、作製される。これらの抗体は両方IgMであり、従って大きさが大きいという事実は、これらのVEGF：レセプター複合体に対する選択性にとって重要であり得る。

## 【0265】

抗N末端抗体は、VEGFにより媒介される内皮細胞増殖を阻害しなかった。このことは、VEGFのN末端がレセプター相互作用に関与しないこと、およびVEGFのN末端に対する抗体がVEGFにより媒介されるシグナル伝達を妨害しないことを示唆する。

## 【0266】

対照的に、2C3は、3 nMのIC<sub>50</sub>で、内皮細胞のVEGFにより媒介される増殖を阻害する。KDR発現内皮細胞（ABAE細胞）を用いる<sup>125</sup>I-VEGF結合試験は、2C3が、VEGFのKDRへの結合を、濃度依存の様式でブロックすることを実証した。従って、2C3は、VEGFのそのレセプターへの結合を妨害することにより、インビトロで、KDR（VEGFR2）により媒介されるVEGF活性を中和し得る。

## 【0267】

免疫組織化学的分析は、GV39M、11B5、3E7、および7G3が、脈管内皮の断片に直接適用される場合に、脈管内皮と中程度～強力に反応することを、明らかにした。GV39Mは、腫瘍内非細胞に対する最も高い特異性を示し、腫瘍細胞または結合組織の染色がかなり少ない。11B5、3E7、および7G3は、低濃度で適用される場合に、内皮細胞を優先的に染色するが、より高い濃度において、腫瘍細胞および結合組織を別々に染色する。

## 【0268】

11B5、3E7および7G3で観察される染色パターンは、VEGFの特定

のコンホメーションについて優先を有さないVEGFに対するポリクローナル抗体を使用する場合に見られる染色の型に代表的である(Lin-Keら、1996; Plateら、1994; Claffeyら、1996)。GV39Mによる内皮の選択的な染色は、これがこれらの細胞上のVEGF：レセプター複合体に結合することを示唆し、そしてレセプターの内皮細胞位置、およびGV39MがELISAにおいてVEGF：sFlk-1に選択的に結合するという事実と一致する。

#### 【0269】

同様に、3E7および7G3のより広い染色パターンは、これらが遊離VEGFおよびレセプター結合VEGFの両方を認識する能力に一致する。しかし、11B5は、内皮に対してより制限された染色パターンを有すると予測された。なぜなら、これは、捕捉ELISAにおいてVEGF：Flk-1を強く好むからである(表2を参照のこと)。11B5が、間質成分に結合するVEGFを認識し得ることは可能であり、腫瘍断片におけるより広い反応性パターンを与える。

#### 【0270】

3E7およびGV39Mは、インビボで、腫瘍組織の脈管内皮細胞に選択的に局在化し、一方で2C3は、内皮に加えて、腫瘍の脈管周囲の結合組織に局在化する。腫瘍を有するマウスへの静脈内注射の24時間後に、3E7は、腫瘍以外のいかなる組織の内皮でも検出可能ではなかった。他方で、GV39Mもまた、腎臓の糸球内の内皮細胞または血管間膜細胞に結合する。GV39Mの、マウス腎臓血管間膜細胞との反応性の理由は、明らかではない。抗体が、腎臓の正常な内皮細胞上のVEGF：レセプター複合体に結合することが、可能である(Takahashiら、1995)。しかし、同型の株10腫瘍を有するモルモットにおける局在化試験は、GV39Mが腫瘍血管に局在化するが、他の正常な組織における糸球または脈管には局在化しないことを示した。

#### 【0271】

3E7およびGV39Mが腫瘍内皮に特異的に局在化する能力は、恐らく、少なくとも2つの要因の結果である。第一に、VEGF：レセプター複合体は、腫瘍血管に対して比較的豊富である。なぜなら、低酸素性腫瘍微小環境は、腫瘍細



胞によるVEGF発現を、そして内皮細胞によるVEGFレセプター発現を、刺激するからである。第二に、腫瘍血管は、正常な血管より透過性であり（Yuanら、1996）、このことは、抗体が、脈管の管腔から離れた面に濃縮しているようであるVEGF：レセプター複合体に、より多くアクセスすることを可能にし得る（Lin-Keら、1996；Hongら、1995）。

#### 【0272】

Lin-Keおよび共同研究者らによる以前の研究（1996）において、ラットVEGFのN末端に指向されるウサギポリクローナル抗体は、TA3/Stマウス乳癌またはMOT卵巣癌を有するマウスへの注射後に、腫瘍内皮細胞に局在化することが見出された。対照的に、全VEGFタンパク質に指向するウサギポリクローナル抗体（Ab-618）は、これらの腫瘍においても、腫瘍自体の他の位置においても、内皮細胞に特異的に局在化しなかった。

#### 【0273】

これらの結果に基づいて、Lin-Keら（1996）は、VEGFが毛細血管内皮と会合した後にVEGFのN末端が抗体を結合する能力を有すること、および無細胞VEGFまたは非内皮細胞と結合したVEGFのプールが、非N末端エпитープに指向する抗VEGF抗体を濃縮するには十分ではないことを、結論付けた（Lin-Keら、1996）。VEGFのN末端に指向する3E7およびGV39Mを用いた本結果は、これらの結論を支持する。

#### 【0274】

しかし、2C3群の抗体（これは、VEGFの非N末端エピトープに指向する）がマウスの固形腫瘍の脈管構造および脈管周囲の結合組織の両方に局在化するという、本発明の知見は、Lin-Keら（1996）の研究より顕著に驚くべきことである。本発明は、VEGFの「プール」が、腫瘍支質に存在し、そして実際に、腫瘍質量における2C3の濃縮を可能にすることを、提唱する。このような腫瘍支質の標的化は、以前の刊行物の研究からは予測し得なかった。本発明者らは、VEGFが、腫瘍中のヘパリンスルフェートプロテオグリカン（HSPG）に結合し得ることを考慮するが、作用の機構の理解は、本発明を実施する際に特に必要ではない。

## 【0275】

本発明の初期の結論は、GV39M群および3E7群の抗体はマウスの腫瘍内皮細胞に選択的に局在化するが、2C3群の抗体は、腫瘍内皮細胞および腫瘍の脈管周囲の結合組織に局在化する、ということである。VEGFおよびそのレセプターの分布は、マウスおよびヒトにおいて類似であるので、これらの抗体は、ガン患者において類似のパターンの局在化を示すことが、考慮される。従って、GV39Mおよび3E7は、ヒトにおける腫瘍脈管に治療薬または診断薬剤の送達における使用が予測され、一方で2C3群の抗体は、腫瘍脈管および腫瘍結合組織への、治療剤または診断薬剤の標的化のためのビヒクルとして、考慮される。

## 【0276】

(B2. VEGFR2遮断抗VEGF抗体および抗2C3抗体)

2C3群の抗体のさらなる研究は、なおさらなる驚くべき特性を明らかにし、本発明の効果的な組成物および使用を生じた。

## 【0277】

ELISA、レセプター結合アッセイおよびレセプター活性化アッセイを使用してなされた、本発明の重要な発見は、2C3群のモノクローナル抗体が、VEGFのVEGFR2 (KDR/FLK-1) との相互作用を選択的にブロックするが、VEGFR1 (FLT-1) との相互作用をブロックしないことである。2C3抗体は、VEGFR2のVEGFにより誘導されるリン酸化を阻害し、そしてVEGFにより誘導される透過性をブロックし、このことは、VEGFR2をVEGFにより誘導される透過性の原因となるレセプターとして関連させる。2C3抗体はまた、強力な抗腫瘍活性を有し、当該分野において認証されているヒト癌の動物モデルにおいて、種々の確立されたヒト固形腫瘍の増殖を停止させる。

## 【0278】

これらの発見は、VEGFR1およびVEGFR2の両方を発現する細胞において、VEGFにより活性化される経路を分析する際に、2C3が有用ではないことを実証し、腫瘍の増殖および生存のプロセスにおけるVEGFR2活性の重

要性を強調している。より重要なことには、これらは、治療的介入の独自の様式を提供し、マクロファージ走化性、破骨細胞および軟骨吸収細胞の機能（VEGFR1により媒介される）の付随した阻害なしに、VEGFR2により誘導される新脈管形成の特異的な阻害を可能にする。

#### 【0279】

従って、2C3を考慮する発見は、初めて、VEGFR2のみに結合してVEGFR1には結合しないVEGFを阻害する、抗VEGF抗体の作製および使用の動機および手段を提供する。このような抗体は、簡潔に「VEGFR2遮断抗VEGF抗体」と称され、当該分野における利点を示し、そして多数の利点を提供する（いずれも、結合体化していない、すなわち「裸の」形態での使用、および他の治療薬剤と結合体化した、すなわち会合した場合の使用の意味で）。

#### 【0280】

本発明のインビトロ結合研究（精製レセプタータンパク質を用いてELISAおよび同時沈降アッセイを利用する）は、2C3が、VEGFのVEGFR2への結合をブロックすることを実証した。驚くべきことに、2C3は、どのアッセイにおいてもVEGFのVEGFR1への結合を阻害しなかった。最初の結果を確認するために結合ELISAを異なる構成において反復した。各々の構成において、その結果は、2C3はVEGF：VEGFR1相互作用を妨げないことを示した。これらの研究のコントロールとして、モノクローナル抗体3E7（VEGFのNH<sub>2</sub>-末端に対する抗体）を使用した。これは、VEGFのVEGFR1に対する結合も、VEGFR2に対する結合も妨げなかった。

#### 【0281】

従って、本発明の抗体の2C3群は、VEGFに対する他の遮断抗体（A4.6.1を含む）を超えて有意に改善されている。A4.6.1抗VEGF抗体は、VEGFがVEGFレセプター両方に結合することをブロックする。結晶学的研究および変異誘発研究により、VEGFR2およびVEGFR1についての結合エピトープが、VEGFダイマーの2つの対称的な極に向かって集中していることが示された（Wiesmannら、1997；Mullerら、1997）。2つのレセプターと相互作用するVEGF上の結合決定基は、部分的に重複し

、かつダイマー表面にまたがる異なる4つのセグメント上に分布する(Mullerら、1998)。抗体A4.6.1は、両方のレセプターのレセプター結合領域内にあるVEGFの領域に結合する(Mullerら、1998)。2C3がVEGFR2結合部位の近くに存在する領域に結合するが、VEGFR1結合部位には結合しないことが提唱される。

#### 【0282】

レセプターのVEGF誘導リン酸化に対する2C3の効果についての研究により、VEGFR2のVEGF誘導リン酸化をブロックすることが示された。これはまた、上記で議論されるデータに対応し、そしてVEGF誘導増殖における役割をさらに固める。

#### 【0283】

他の研究からの結果と同様に、VEGFR1の一致したVEGF誘導リン酸化は、実証できなかった(De Vriesら、1992; Waltenbergerら、1994; Davis-Smythら、1996; Landgrenら、1998)。従って、2C3が、VEGFR1のVEGF7誘導リン酸化を阻害するか否かを容易に判定することはできなかった。VEGFR1リン酸化に対するVEGFの低能力は、VEGFR1が、内皮細胞上のシグナル伝達レセプターではなく、VEGFを捕捉し、かつVEGFR2を介したシグナル伝達を増幅するデコイレセプターとして働き得ることを示唆することを導き得る(Hiratsukaら、1998)。しかし、VEGF結合によるVEGFR1のチロシンリン酸化は、ヒト微小血管内皮細胞(HMEC)を用いてKupprionら(1998)により、そしてVEGFR1を過剰発現するNIH 3T3細胞を用いてSawanoら(1996)により報告されている。さらに、Waltenbergerら(1994)は、VEGF誘導VEGFR1活性化がインビトロキナーゼアッセイを用いた結果として起こり得ることを示した。VEGFR1のVEGF誘導リン酸化に対する2C3の効果、またはその欠如は、前述の細胞型の1つまたはインビトロキナーゼアッセイを用いて決定し得た。

#### 【0284】

本発明の図2のELISAデータおよび細胞結合データは、2C3抗体がVE

GFR1およびVEGFR2両方を発現する細胞への結合からVEGFを完全にはブロックしないことを示す。2C3がVEGFR1へのVEGF結合をブロックしないという事実は、2C3抗体が、内皮細胞および他の細胞型の、生物学におけるVEGFR1の役割を表す際に有効なツールであることを意味する。

#### 【0285】

2C3がVEGFをそのレセプターを活性化することからブロックする際に示す選択性の機能的結果を、モルモットにおけるMiles透過性アッセイを用いて試験した。2C3およびA4.6.1両方が、IgGがVEGFより少なくとも10倍モル濃度で過剰にある場合に、VEGF誘導透過性を阻害した。3E7およびコントロール抗体は、1000倍モル濃度過剰ですら、VEGF誘導透過性を阻害しなかった。これらの結果は、VEGFR2がVEGF誘導透過性に関与することを示す。

#### 【0286】

VEGF-Cの新規の形態および2つのウイルス誘導VEGF-E改変体がVEGFR2を結合するが、VEGFR1を結合しないという最近の報告に従うこの知見は、血管透過性を増強する能力をなお維持する。(Joukovら、1998; Ogawaら、1998; Meyerら、1999)。おそらく、種々の形態のVEGFは、NO生成を引き起こすVEGFR2を介してシグナルを伝達し、このことは、次いで、血管透過性の増加を引き起こす(HoodおよびGranger、1998; Hoodら、1998; KrollおよびWalter nberger、1998; Muroharaら、1998; Kupprionら、1998; Sawanoら、1996; Fujiiら、1997; Parentiら、1998)。このことは、NO生成がVEGFR2活性化の結果に対して示されたので、VEGFR2関与で間接的に示される。しかし、Couperら(1997)のように、対照的に、VEGFにより誘導された血管透過性の増加とインビトロでのVEGFR1発現との間の強い相関を見出したいくつかの証拠もまた存在する。

#### 【0287】

2C3は、インビボで複数の異なるヒト腫瘍型の増殖を阻害した。1週間に2

回与えた100  $\mu$ gの2C3の効果は、マウスが有する皮下のNCI-H358 NSCLCおよびA673横紋筋肉腫腫瘍において同一であり、ここで、約150mm<sup>3</sup>サイズの小節にまで、腫瘍の増殖を効率的に制限した。同様の応答が他の腫瘍小節において見られた（例えば、HT29およびLS174T（共に結腸のヒト腺腫））。

#### 【0288】

2C3による腫瘍増殖抑制の規模は、異なる中和抗VEGF抗体を用いて他の研究者らにより報告されたもの（Asanoら、1998；Mesianoら、1998）と同様である。モノクローナルラット抗マウスVEGFR2抗体はまた、抗脈管形成機構（Skoobeら、1997）を介して、マウスにおける悪性ヒトケラチノサイトの増殖を強くブロックした。2C3の有効性（他の研究者が異なる抗VEGF抗体を用いて見出したものと類似である）は、腫瘍脈管形成および腫瘍増殖におけるVEGFの役割をさらに示す。しかし、2C3は、本明細書中で議論される特異的阻害特性に基づいて、より安全な治療剤を提供する。

#### 【0289】

ヒトの状態により近い設定においてVEGF活性を阻害する効果を分析するために、腫瘍を確立したマウスを、2C3で処置した。この設定において、2C3処置は、2つの攻撃的なヒト腫瘍であるA673横紋筋肉腫およびLS174T結腸腺腫腫瘍の増殖を有意に遅延させた。2C3抗体は、マウス保有NCI-H358 NSCLC腫瘍において有意な腫瘍後退を引き起こした。

#### 【0290】

2C3またはA4.6.1で処置された腫瘍は、処置の約10週間後、それらの元々の大きさの、それぞれ30%および35%まで消失した。処置が、過去100日まで伸長されることが可能にされた研究において、さらにより有意な後退が観察された。この結果は、VEGFが腫瘍内皮についての有糸分裂シグナル以上を提供することを示す。

#### 【0291】

腫瘍の静止より、むしろ後退という事実が観察されたことは、VEGFが腫瘍内皮についての脈管形成シグナル以上を提供することを示唆する。Benjam

inら(1999)は、腫瘍は、周辺内皮細胞との接触が確立されてた未熟な血管の大きな画分を含むこと、そしてこれらの血管が生存についてVEGFに依存することを、最近報告した。VEGFの中和が、これらの未熟な血管に、アポトーシスを起こし、それによって、腫瘍内に存在する血管ネットワークの減少を引き起こすことが可能である。血管再構築の動態過程が腫瘍を生じることまた可能であり、血管形成および血管後退の両方に関係し、そしてVEGFの中和は、血管後退に向うネットシフトにつながる血管形成を予防する。

#### 【0292】

2C3が、A4.6.1と同様に完全に腫瘍の増殖を抑制するという発見(よりそうでない場合)は、腫瘍血管形成におけるVEGFR2の主要な役割を示す。多段階の血管形成は、内皮細胞走化性、メタロプロテイナーゼ産生、浸潤、増殖および分化を必要とする。VEGFR1は、これらのプロセスにおいて役割を有し得ないか、またはVEGFに結合し、そしてシグナル伝達レセプター、VEGFR2に提示することによるプロセスにおいて補助し得る。

#### 【0293】

腫瘍の処置における2C3とA4.6.1についての比較図は、高度に関連する: 2C3は、わずかによりA4.6.1より効果的であるが、VEGFR2に結合するのみであり、VEGFR1に結合しない。従って、現在の研究は、VEGF媒介性腫瘍血管形成においてVEGFR1が著しい役割を果たさないことを示し、そしてさらにVEGFR1特異的インヒビターが腫瘍血管形成に影響し得ないことを示す。これらの結果はまた、2C3がA4.6.1と同様であるか、またはより効果的であり、一方より少ない副作用を生じること示す。

#### 【0294】

VEGFのVEGFR2への結合およびVEGFR2の活性化を特異的にブロックする能力は、臨床的な関連性の2つの領域における重要性を有する。第1に、VEGFR1(Flt-1)は、マクロファージおよび単球細胞が、VEGFR1を発現し、そしてVEGFR1シグナル伝達を介してVEGFに対して走化的に応答する際に、腫瘍におけるマクロファージおよび単球の補充において重要な役割を果たすと考えられる(Claussら、1996; Hiratsuka

ら、1998; Akuzawaら、2000)。マクロファージの活性化において、*flt-1* 遺伝子の転写は、*Egr-1* の誘導を通じて刺激される。*Egr-1* は、ヒト *flt-1* プロモーターにおけるオーバーラップ *Egr-1* / *Sp1* 転写因子結合部位に結合し、*flt-1* 遺伝子が直接の *Egr-1* の標的であり、転写因子がマクロファージの分化において優性に誘導される証拠を提供する (Akuzawaら、2000)。

#### 【0295】

硬直抗腫瘍応答を産生するために必要とされるマクロファージの活性化を維持するために、*VEGFR1* シグナル伝達の障害が避けられるべきである。本発明によって提供される *VEGFR1* の特異的な遮断は、従って、腫瘍療法において A4.6.1 に勝る重要な利点を提供する。なぜなら、マクロファージの浸潤が、障害されず、これらの細胞が、壊死細胞から腫瘍細胞細片を除去し、腫瘍の収縮を促進することを可能にするからである。*VEGFR2* 遮断を使用して、抗 *VEGF* 抗体 (例えば、2C3) はまた、マクロファージが浸潤し、腫瘍細胞への直接の細胞を殺す効果を有することによって全体の抗腫瘍効果に寄与することを可能にする。

#### 【0296】

確かに、本発明は、抗血管形成治療のすべての形態における使用に有利な因子を独自に提供する。それらの因子は、*VEGF* 血管形成活性をブロックする能力によって有利であるが、*VEGFR1* を通じて媒介される *VEGF* の他の有利な作用 (例えば、免疫および骨細胞への作用) を障害しない。臨床的に重要性の第2の領域は、本発明に従って調製され、インビボで、破骨細胞および軟骨吸収細胞の有益な効果を障害しないで機能する抗体の能力に関する。これは、存在する *VEGFR2* 遮断抗 *VEGF* 抗体療法 (2C3を含む) の使用を意味し、骨および／または軟骨への副作用に関連しない。

#### 【0297】

インビボでの研究は、*VEGF* が、軟骨内の骨形成の間の肥大性軟骨リモデリング、骨形成および血管形成に共役し、そして *VEGF* が、軟骨リモデリングに必須であることを示した (Gerberら、1999; 参考として具体的に本明



細書中に援用される)。可溶性VEGFR1レセプターキメラタンパク質(F1t-(1-3)-IgG)の投与によるVEGFR1を介したVEGFシグナル伝達の不活性化は、軟骨細胞の漸増および／または分化を減少することによって小柱骨形成および肥大性軟骨細胞領域の増大を障害することが示された(Gerberら、1999)。

#### 【0298】

VEGFが、インビボでの破骨細胞機能を支持してマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)を置換し得ることがさらに示された(Niidaら、1999; 参考として具体的に本明細書中に援用される)。M-CSF遺伝子に変異を生じる破骨細胞に欠失を有する大理石骨病(op/op)マウスを使用する研究において、組換えヒトM-CSF(rhM-CSF)の注射は、破骨細胞漸増および生存を可能にする。最近の研究において、組換えヒトVEGFの一度の注射が、op/opマウスにおいて破骨細胞漸増を同様に誘導することが示された(Niidaら、1999)。

#### 【0299】

Niidaら、(1999)は、破骨細胞が優性にVEGFR1を発現し、そして破骨細胞漸増に対する組換えヒト胎盤増殖因子1の活性がrhVEGFのものに比較できるので、破骨細胞(op/op)マウスにおけるVEGFシグナル伝達の有益な効果は、VEGFレセプター1(VEGF-1)を介して媒介されることを報告した。これらの著者は、VEGFが阻害された後に(VEGFR1レセプターキメラタンパク質、VEGFR1/Fcを使用する)、rhM-CSF誘導破骨細胞は死ぬが、このような効果は、rhM-CSFの同時注射によって抑制されることをさらに示した。rhM-CSFまたは内因性VEGFによって支持される破骨細胞は、インビボでの活性における有意な差を示さなかった(Niidaら、1999)。

#### 【0300】

大理石骨病の年齢に関連した回復を起こす変異体op/opマウスは、破骨細胞数における増加を伴う。Niidaら(1999)の研究において、ほとんどの破骨細胞は、抗VEGF抗体の注射後に消失し、内因的に産生されたVEGF

が、変異体マウスにおける破骨細胞の出現の原因であることを実証した。さらに、rhVEGFは、インビトロでの破骨細胞の分化を支持してrhM-CSFを置換した。これらの結果は、M-CSFおよびVEGFが、破骨機能を支持して重なる機能を有し、そしてVEGFが、VEGFR-1レセプターを介して作用することを実証する(Niidaら、1999)。

#### 【0301】

従って、2C3、VEGFR2遮断の第1、本発明の抗VEGF抗体が、VEGFを、VEGFR1を結合し、そして活性化することをブロックしないが、VEGFがVEGFR2を結合し、そして活性化することをブロックすることが結論付けられ得る。このようなVEGFR2阻害の抗腫瘍効果は、明白に実証される。これらの結果は、VEGFR2が、透過性を媒介し、そして腫瘍血管形成におけるその役割をハイライトするVEGFレセプターであることを示す。従って、本発明はさらに、固体腫瘍の処置のための治療としてのVEGF阻害を確証する。より重要には、本発明は、新しいVEGFR2遮断の範囲、抗VEGF抗体(例えば、治療介入のための2C3に基いた抗体)、そして特に腫瘍および他の疾患における血管形成を阻害する安全、かつ有効な薬剤としての使用を提供する。

#### 【0302】

本発明の利点は、副作用の欠失に限定されない。しかし、これらは、特に骨障害を有する子供および患者の処置において著しい利点を有する重要な特徴であり、本発明の抗体は多数の他の利点を有する。

#### 【0303】

例えば、VEGFR2遮断抗VEGFまたは2C3抗体に基づく抗体結合体は、腫瘍環境に治療因子を送達するために使用され得る。実際に、2C3抗体は、インビボでの投与の際に腫瘍脈管構造および腫瘍支質の両方に結合し、正常器官または組織における脈間管構造にも結合組織にも結合しないことが本明細書中で示される。本発明の抗体に基づく治療構築物は、従って、1分子内に2つの機能を結合する利点を有する：抗体またはそのフラグメントの抗脈管形成特性および治療因子の特性は、付着について選択される。

## 【0304】

VEGFR2が、内皮上のキーレセプターであるので、VEGFR2への遮断VEGFの結合は、抗脈管形成効果に重要である。この文脈において、VEGFR1は、内皮上で発現されるが、非シグナル伝達であるか、または受動的である。従って、VEGFR1に結合するVEGFをブロックする本発明の抗体の無能は、抗脈管形成および抗腫瘍因子としてのそれらの有効性に対する結果を伴わない。実際に、先行技術の遮断抗体と共に生じるVEGFR1に結合するVEGFを阻害するよりもむしろ、VEGFに結合する本発明の抗体の能力および、さらにVEGF-VEGFR1相互作用を実質的に妨害しない能力は、これらの新しい抗体の薬剤送達特性を増強する。

## 【0305】

本発明者らは、遮断抗体は、レセプターに結合されていない腫瘍局在化VEGFに結合することによって腫瘍環境へ治療因子を送達するために機能するとさらに期待されることを理解した。具体的には、本発明者らは、このような抗体は、腫瘍支質においてVEGFに結合し、そしてそこに治療因子を送達することを理解した。これは、内皮周辺に薬剤の貯蔵所を提供し、血管内皮細胞に細胞毒性または他の破壊性の効果を引き起こし、そして抗腫瘍効果を発揮する。

## 【0306】

支質または結合組織と結合したVEGFは、伝統的な意味でVEGFレセプター（すなわち、細胞表面レセプター）に結合していない。むしろ、VEGFは、VEGFの基礎的な領域を介して1以上の結合組織成分（プロテオグリカン（例えば、ヘパラン硫酸プロテオグリカン）を含む）に結合している。これらの配列（およびそれらをコードするエキソン）は、VEGF121タンパク質（および根底にあるDNA）内にないので、このアイソフォームは、有意な量で支質に存在するべきではない。腫瘍支質におけるVEGFは、「遊離した」としばしば呼ばれるが、腫瘍内にまだ局在化しており、「遊離した」は非レセプター結合を基本的に意味する。

## 【0307】

本発明者らは、両方のレセプターではなく、1つのレセプターに結合するVE

G Fをブロックする抗体が、脈管構造上のV E G Fに結合したレセプターに結合することによって、治療薬剤を腫瘍環境に送達し得ることをさらに推論する。これは、本発明の最も多くの利点の1つである。すなわち、抗体の規定は、V E G F R 2へ結合するV E G Fをブロックし、それ故、V E G Fからの脈管形成シグナルの阻害するが、V E G F R 1に結合するV E G Fをブロックしない。他の細胞型および組織におけるV E G F R 1を介したV E G Fシグナル伝達を維持することによって全身性副作用を減少することに加えて、これらの抗体は、腫瘍脈管構造上のV E G F－V E G F R 1複合体に局在化し、そして直接そこに、治療因子を送達し得る。

#### 【0308】

V E G F R 1およびV E G F R 2の両方は、正常組織における内皮細胞とは反対に、腫瘍内皮細胞上で上方制御される。V E G F R 1は、腫瘍脈管内皮上で高度に発現され、本発明の標的とする局面を特に有効にする。実際に、V E G F R 1は、内皮において「非シグナル伝達」であるが、より高いレベルでない場合に、少なくともV E G F R 2と同じレベルで発現される。この減少の根底にある因子は、低酸素症およびV E G Fの両方に応答してV E G F R 1が上方制御され、一方でV E G F R 2は、V E G Fに応答して上方制御されるのみであり、そして低酸素症によって影響されないことである。

#### 【0309】

内皮に対するV E G F R 1の役割は、不確かなままであるが、V E G F R 1は、デコイレセプターとして作用し得、V E G Fを「捕捉」し、そしてリガンドをシグナル伝達レセプター、V E G F R 2に渡す。これを実現するために、デコイレセプターが、シグナル伝達レセプター（実際の場合である）よりも、より高いV E G Fに対する親和性を有することが期待される。この点において、そしておそらく、増強された発現レベルのためにもまた、本発明のV E F G R 2遮断、非V E G R F 1遮断抗体は、腫瘍の処置のために理想的な送達因子である。これらの抗体の治療結合体は、V E G F R 2を通じた新脈管形成および存在する脈管構造の破壊を、V E G F－V E G F R 1レセプター複合体に治療因子を送達することによって同時に阻害し得る。

## 【0310】

本発明者らは、本発明の抗体の有益な抗脈管形成および腫瘍局在化特性の説明としての上記の科学推理に決して限定されない。本発明の有用性は、自明であり、そして根底にある理論が実行されることは必要としないが、本発明者らは、代替のメカニズムを考慮し、このメカニズムによってVEGFR2遮断、非VEGFR1遮断抗体が、腫瘍脈管構造に有効にかつ特異的に局在化し得ると考えた。

## 【0311】

このような抗体は、VEGFに結合し得、細胞表面上のNpnd1または別のまだ特徴付けられていないVEGF結合タンパク質に関連するか、または、内非細胞の表面上でヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合したVEGFに結合し得る。抗体の局在化はまた、血管に関連するタンパク質のVEGFファミリーの別のメンバー（すなわち、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D）に結合することによっても増強され得るが、これはより可能性が低い。

## 【0312】

本発明のVEGFR2遮断抗VEGFまたは2C3抗体の別の有利な特性は、VEGFR2を介して媒介されるこれらの抗体が生存シグナルまたはVEGFの「保護効果」を中和することである。自身がより有効な抗体を作製することに加えて、この特性は、VEGFの生存機能によって妨害される他の因子と組み合わせることによってそれらを特に有用にする。

## 【0313】

例えば、VEGFは、内皮を放射線治療から保護する。従って、本発明の裸の抗体および免疫複合体の両方は、放射線治療と組み合わせられる使用に理想的である。まださらなる利点は、放射線療法因子に付着した、このような抗体の使用によって提供される。この型の構築物は、以下の3つの利点を有する：（1）抗体部分を通じた抗脈管形成効果を及ぼすこと；（2）放射線治療因子の送達を通じた腫瘍脈管構造破壊効果を及ぼすこと；および（3）VEGFの典型的な生存シグナルが、放射線治療因子の効果を相殺することから防ぐこと。

## 【0314】

類似の相乗的な効果を有する他の構築物は、抗チューブリン薬剤またはプロド

ラッグ、抗アポトーシス因子および他の抗脈管形成因子と関連する V E G F R 2 遮断抗 V E G F 抗体である。アポトーシスを引き起こす因子または薬剤の作用は、V E G F によってアンタゴナイズされる。従って本発明は、このような因子の有効性を、V E G F を中和することによって改善する。V E G F の生存シグナルはまた、この治療を限定するエンドスタチン (e n d o s t a t i n) に反対する。従って、エンドスタチンと組み合わせられた使用において、本発明の V E G F R 2 遮断抗 V E G F、または 2 C 3 抗体は、V E G F を中和し、そしてエンドスタチンの抗腫瘍効果を増幅する。2 C 3 または他の V E G F R 2 遮断抗 V E G F 抗体はまた、腫瘍にコラゲナーゼを特異的に送達するために使用され得、ここでコラゲナーゼは、インサイチュでエンドスタチンを産生し、類似の利点を達成する。

#### 【0315】

すべてのこのように増強された、または相乗作用の組み合わせにおいて、抗体および他の因子は、別々に投与され得るか、または第2の因子が、特異的な送達のために抗体に連結され得る（すなわち、V E G F R 1 への標的化された送達）。エンドスタチンとの組み合わせにおいて、化学結合体または組換え融合タンパク質が好ましい。なぜなら、これらは、エンドスタチンの短い半減期を相殺するからであり、エンドスタチンの短い半減期は現在、潜在的なエンドスタチン療法の限定である。組織プラスミノゲン活性化因子 (t P A) との組み合わせ、または標的化された形態の組織プラスミノゲン活性化因子 (t P A) はまた、使用され得る。

#### 【0316】

本発明の治療のさらなる利点は、間隙の圧力を下げる能力を含む。V E G F 媒介性の増加した浸透性が、間隙の圧力に寄与するので、V E F R 2 を介する減少されたシグナル伝達は、浸透性および間隙圧力の両方を減少する。順番に、薬剤が全体の腫瘍組織横断する障壁を、これは減少し、その結果、脈管構造から遠い腫瘍細胞は殺され得る。長期の治療はまた、本発明の組成物が無視できるか、またはより低い免疫原性を有さない場合に達成され得る。

#### 【0317】

## (B 3. 2 C 3 抗体 C D R 配列)

用語「可変性」は、本明細書中で抗体に関連して使用される場合、可変性ドメインの特定の部分を意味する。このドメインは、抗体の間の配列において、大規模に異なる。この用語は、特定の抗体に対する各特定の抗体の結合および特異性において使用される。しかし、可変性は、抗体の可変性ドメインに渡って、一様に分配されない。それは、「超可変性領域」と呼ばれる3つのセグメントに集中される。超可変性領域は、軽鎖および重鎖可変領域の両方にある。

## 【0318】

可変ドメインのより高度に保存された部分は、枠組み領域 (F R) と呼ばれる。ネイティブな重鎖および軽鎖の可変ドメインの各々は、4つのF R (それぞれF R 1、F R 2、F R 3およびF R 4) を含み、大部分は $\beta$ シート立体配置を採用し、3つの超可変性領域に結合され、連結するループを形成し、そしていくつかの場合、 $\beta$ シート構造の一部を形成する。

## 【0319】

各鎖における超可変領域は、F Rに近接して一緒に保持され、そして他の鎖からの超可変領域は、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する (K a b a t ら、1991、参考として本明細書中に具体的に援用される)。定常ドメインは、抗原への抗原の結合に直接に関係しないが、種々のエフェクター機能 (例えば、抗原依存性細胞性毒性における抗原の関与) を示す。

## 【0320】

用語「超可変性領域」は、本明細書中で使用される場合、抗体のアミノ酸残基を言い、抗原結合の原因である。超可変領域は、「相補性決定領域」または「C D R」からのアミノ酸残基 (すなわち、軽鎖可変ドメインにおける残基24~34 (L 1)、50~56 (L 2) および89~97 (L 3) および重鎖可変ドメインにおける31~35 (H 1)、50~56 (H 2) および95~102 (H 3) ; K a b a t ら、1991、参考として本明細書中に具体的に援用される) および/または「超可変領域ループ」からの残基 (すなわち、軽鎖可変ドメインにおける残基26~32 (L 1)、50~52 (L 2) および91~96 (L 3) および重鎖可変ドメインにおける26~32 (H 1)、53~55 (H 2) お

よび96～101(H3))を含む。「枠組み」または「FR」残基は、本明細書中で定義される超可変領域残基よりも可変ドメイン残基である。

#### 【0321】

2C3 ScFvフラグメントのVhおよびVk鎖のDNAおよび推定アミノ酸配列は、本明細書中に配列番号6、7、8および9として提供される。これらの配列は、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域のCDR1～3を含む。

#### 【0322】

本明細書中に記載されるように(第C3章)、生物学的分子に関する構造のおよび機能的情報の規定について、相当する範囲、または改良された分子でさえも産生され得る。これは、2C3抗体によって例示される本発明のVEGFR2遮断抗VEGF抗体を適用する。抗原結合および抗原の他の機能的特性が、保存されなければならないが、相当する、そしてさらに改善された抗体(一旦参考抗体が産生された)を作製する当該分野における非常に高度の技術が存在する。このような技術的熟練は、本明細書中で提供される配列および情報に関して、さらなる抗体の産生に適用される。この抗体は、改善された、または別の望まれる特徴を有する。

#### 【0323】

等価な抗体については、特定のアミノ酸は、相互作用的結合能力の明らかな損失なしで、抗体定常ドメインフレームワーク領域または抗体可変ドメインフレームワーク領域における他のアミノ酸と置換され得る。このような変化が、この抗体部分をコードするDNA配列においてなされること、およびこの変化が、天然において保存的であること(セクションC3、表Aにおけるコドン情報、および部位特異的変異原性を支持する技術的詳細を参照のこと)が好ましい。自然には、なされるべき変化の数は限定されるが、これは当業者に公知である。

#### 【0324】

他の型の改変体は、それらが産生される親抗体に関する改良された生物学的特性を有する抗体である。このような改変体(すなわち、第二世代化合物)は、代表的には、親抗体の1以上の置換された超可変領域残基を含む置換改変体である。このような置換改変体を産生するための便利な方法は、ファージディスプレイ



を用いる親和成熟である。

#### 【0325】

ファージディスプレイを用いる親和成熟においては、いくつかの超可変領域部位（例えば、6～7部位）は、変異して各部位におけるすべての可能なアミノ酸置換を生じる。このように産生された抗体改変体は、各粒子内に詰め込まれたM13の遺伝子III産物と融合する場合、一価の様式で繊維状ファージ粒子から表示される。次いで、ファージディスプレイされた改変体は、本明細書中に開示されるようなそれらの生物学的活性（例えば、結合親和力）についてスクリーニングされる。改変のための候補超可変領域部位を同定するために、アラニン走査変異原性を行い、抗原結合に著しく寄与する超可変領域残基を同定し得る。

#### 【0326】

あるいは、またはさらに、抗原-抗体複合体の結晶構造は、抗体とVEGFとの間の接点を同定するために描写され、分析されることが意図される。このような接触残基および隣接残基は、置換の候補である。一旦このような改変体が生じると、改変体のパネルは、本明細書中に記載されるようにスクリーニングに供され、そして1以上の関連するアッセイにおいて類似の特性を有するが、異なる特性または優れた特性さえも有する抗体は、さらなる開発のために選択される。

#### 【0327】

従って、本発明のさらなる局面は、VEGFR2遮断抗体（抗VEGF抗体）重鎖および軽鎖（例えば、2C3重鎖および軽鎖）のCDR領域をコードする単離されたDNAセグメントおよび組換えベクター、ならびにDNA技術の適用を通じた組換え宿主細胞の作製および使用に関連し、これらは、このようなCDR領域を発現する。

#### 【0328】

従って、本発明は、任意の動物（好ましくは、ヒトまたはマウス）から単離可能なDNAセグメントに関し、これは全ゲノムDNAを含まず、そしてVEGFR2遮断抗体（抗VEGF抗体）重鎖および軽鎖（例えば、2C3重鎖および軽鎖）のCDR領域を発現し得る。本明細書中で使用される場合、用語「DNAセグメント」は、特定の種の全ゲノムDNAを含まずに単離されたDNA分子をい

う。用語「DNAセグメント」には、DNAセグメントおよびこのようなセグメントのより小さいフラグメント、ならびに組換えベクター（例えば、プラスミド、コスミド、ファージ、ウイルスなどを含む）もまた含まれる。

#### 【0329】

同様に、コードセグメントまたはVEGFR2遮断抗体（抗VEGF抗体）重鎖および軽鎖（例えば、2C3重鎖および軽鎖）の精製CDR領域をコードする単離された遺伝子部分を含むDNAセグメントは、DNAセグメントといい、このようなコード配列（特定の局面においては、調節配列）を含み、他の天然に存在する遺伝子またはタンパク質コード配列から実質的に離れて単離される。この局面においては、用語「遺伝子」は、機能的タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドコードユニットをいうために単純さのために使用される。この機能的用語は、ネイティブな抗体コード配列および適切な抗原結合タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを発現するか、または発現するように適応され得るより小さな操作された配列を含む。

#### 【0330】

「他のコード配列から実質的に離れて単離される」とは、目的のコードセグメントまたは単離された遺伝子部分は、DNAセグメントのコード領域の重要な部分を形成し、そしてこのDNAセグメントは、天然に存在するコードDNAの大きい部分（例えば、大きな染色体フラグメントまたは他の機能的遺伝子またはcDNAコード領域）を含まないことを意味する。当然、これは最初に単離されたDNAセグメントをいい、そして人の手によってそのセグメントに後から加えられた遺伝子またはコード領域を排除しない。

#### 【0331】

特定の実施形態においては、本発明は、単離されたコードセグメントまたは単離された遺伝子部分、およびVEGFR2遮断抗体（抗VEGF抗体）重鎖および軽鎖（例えば、2C3重鎖および軽鎖）のCDR領域をコードするDNA配列を組み込む組換えベクターに関し、これは少なくとも約75%、より好ましくは、少なくとも約80%、より好ましくは、少なくとも約85%、より好ましくは、少なくとも約90%、そして最も好ましくは、少なくとも約95%のアミノ酸

配列領域あるいは配列番号7または配列番号9のアミノ酸配列と同一のそのようなアミノ酸配列を含み；ここでこのCDR領域は、配列番号7または配列番号9のアミノ酸配列のCDR領域の生物学的特性を少なくとも実質的に維持する。

#### 【0332】

本明細書中で開示されるように、これらの配列は、特定の生物学的に機能的に等価なアミノ酸または「保存的置換」を含み得る。他の配列は、当業者に公知でありそして本明細書中でさらに記載されるように、CDRまたはCDR含有抗体の特性を改良するために故意に操作された、機能的に非等価なアミノ酸または「非保存的置換」を含み得る。

#### 【0333】

アミノ酸および核酸配列は、さらなる残基（例えば、さらなるN末端もしくはC末端アミノ酸または5'もしくは3'配列）を含み得、そしてこの配列が上記の基準（好ましくは、タンパク質発現が関与する生物学的タンパク質活性の維持または改良を含む）に合う限り、さらになお本発明の配列に一致することもまた理解される。末端配列の付加は、コード領域およびまた制御領域の5'部分または3'部分のいずれかに隣接する種々の非コード配列を含む。

#### 【0334】

従って、本発明の核酸セグメントは、他のDNA配列（例えば、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、付加的制限酵素部位、多重クローニング部位、他のコードセグメントなど）と組み合わせられ得、その結果それらの全体の長さはかなり変化し得る。従って、ほとんど任意の長さの核酸フラグメントが利用され得、その全長は、好ましくは、意図される組換えDNAプロトコルにおける調製および使用の容易さによって制限されることが予想される。

#### 【0335】

従って、組換えベクターは、本発明のさらなる局面を形成する。特に有用なベクターは、DNAセグメントのコード部分がプロモーターの制御下で配置されるベクターであることが予想される。一般的に、排他的ではないが、組換えまたは異種プロモーターが利用される（すなわち、プロモーターは通常、それらの天然の環境においてはコード配列を伴わない）。プロモーターが、発現のために選択

された細胞型、生物体において、または動物においてさえ、DNAセグメントの発現を効率的に指向する限り、このようなプロモーターは、細菌プロモーター、ウイルスプロモーター、真核生物プロモーターおよび哺乳動物プロモーターを含み得る。

### 【0336】

タンパク質発現のためのプロモーターおよび細胞型の組み合わせの使用は、分子生物学分野の当業者に公知である。使用されるプロモーターは、構成的（または誘導性）であり得、そして適切な条件下で使用されて導入DNAセグメントの高レベルの発現を指向し得、例えば組換えタンパク質またはペプチドのラージスケールでの産生において有利である。

### 【0337】

本発明の核酸配列の発現は、当業者に公知であり、かつ本明細書中にさらに記載される1以上の任意の標準的な技術によって、都合よく達成され得る。例えば、融合タンパク質の組換え発現についての後の記載は、核酸レベルで別のコード配列に作動可能に会合していない抗体および抗体フラグメントに、同様によく当てはまる。（B4. ポリクローナル抗体）

抗体を調製および特徴付けるための手段は、当該分野において周知である。（例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照のこと；本明細書中で参考として援用される）。ポリクローナル抗血清を調製するために、動物を免疫原性VEGF組成物で免疫し、そして抗血清をこの免疫した動物から収集する。広範な動物種が、抗血清の生成のために使用され得る。代表的に、抗血清の生成のために使用される動物は、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、またはヤギである。ウサギの比較的大容量の血液が理由で、ウサギは、ポリクローナル抗体の産生のために好ましい選択である。

### 【0338】

ポリクローナル抗体の産生において使用されるVEGF免疫原組成物の量は、免疫原ならびに免疫に使用される動物の性質に依存して変動する。以下の種々の経路が、本発明のVEGF免疫原を投与するために使用され得る；皮下、筋内、

皮内、静脈内、腹腔内、および脾臓内。ポリクローナル抗体の産生は、免疫後の種々の時点で免疫された動物の血液をサンプリングすることによって、モニターされ得る。第2の、追加免疫注射もまた与えられ得る。追加免疫する工程および力価測定する工程のプロセスは、適切な力価が達成されるまで反復される。所望の力価レベルが得られた時点で、この免疫した動物を採血し得、そして血清が単離および保存され得る。動物はまた、モノクローナル抗体を産生するために使用され得る。

### 【0339】

当該分野において周知のように、特定の組成物の免疫原性は、アジュバントとして公知の免疫応答の非特異的刺激物質の使用によって増強され得る。例示的なアジュバントとしては完全フロイントアジュバント（殺傷された *Mycobacterium tuberculosis* を含有する、免疫応答の非特異的刺激物質）；不完全フロイントアジュバント；および水酸化アルミニウムアジュバントが挙げられる。

### 【0340】

VEGFをキャリアと連結することによってか、またはVEGFをキャリアにカップリングすることによって達成され得るように、宿主免疫系を追加免疫することもまた所望され得る。例示的なキャリアは、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）およびウシ血清アルブミン（BSA）である。オボアルブミン、マウス血清アルブミン、またはウサギ血清アルブミンのような他のアルブミンもまた、キャリアとして使用され得る。当該分野においてまた公知であるように、所定の組成は、その免疫原性において変動し得る。しかし、VEGFに対する抗体の産生は著しくは困難でない。

### 【0341】

#### （B5. モノクローナル抗体）

モノクローナル抗体（MAb）を産生するための種々の方法がまた、現在当該分野において十分に周知である。最も標準的なモノクローナル抗体の産生技術は、一般的に、ポリクローナル抗体を調製するための技術と同じ系に沿って開始する（Antibodies: A Laboratory Manual、Col

d Spring Harbor Laboratory、1988；本明細書中で参考として援用される）。ポリクローナル抗体応答は、免疫原性VEGF組成物を用いて動物を免疫することによって開始され、そして所望の力価レベルが得られる時点で、その免疫した動物を用いてMAbを産生し得る。

#### 【0342】

MAbは、米国特許第4,196,265号（これは、本明細書中で参考として援用される）に例示される技術のような、周知技術の使用を通して容易に調製され得る。代表的に、この技術は、選択されたVEGF免疫原組成物を用いて適切な動物を免疫することを含む。免疫する組成物は、抗体産生細胞を刺激するのに有効な様式で投与される。マウスおよびラットのような齧歯類は好ましい動物であるが、ウサギ、ヒツジ、およびカエルの細胞の使用もまた可能である。ラットの使用は、特定の利点を与え得る（Goding、1986、第60～61頁；本明細書中で参考として援用される）が、マウスが好ましい。そして、BALB/cマウスは、最も慣用的に使用され、そして一般により高率で安定な融合物を与えるので最も好ましい。

#### 【0343】

免疫後に、VEGFを産生する潜在能を有する体細胞（詳細には、Bリンパ球（B細胞））が、MAb産生プロトコルにおける使用のために選択される。これらの細胞は、生検された脾臓、扁桃、もしくはリンパ節から、または末梢血サンプルから獲得され得る。脾臓細胞および末梢血細胞が好ましい。前者は、脾臓細胞が分裂形質芽球段階にある抗体産生細胞の豊富な供給源であるからであり、後者は、末梢血が容易に利用可能であるからである。しばしば、一団の動物が免疫され、そして最高の抗体力価を有する動物の脾臓が取り出され、そして注射器でこの脾臓をホモジネートすることによって脾臓リンパ球が得られる。代表的に、免疫したマウス由来の脾臓は、約 $5 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$ のリンパ球を含む。

#### 【0344】

次いで、免疫した動物由来の抗VEGF抗体産生Bリンパ球は、不死化骨髓腫細胞の細胞（一般的には、免疫された動物と同じ種の細胞）と融合される。ハイブリドーマ産生融合手順における使用に適切な骨髓腫細胞株は、好ましくは非抗

体産生であり、高い融合効率を有し、そして、次いで所望の融合細胞（ハイブリドーマ）のみの増殖を支持する特定の選択培地中で増殖し得なくさせる酵素欠損を有する。

#### 【0345】

当業者に公知のように、多くの骨髓腫細胞のうちの任意の細胞が使用され得る（G o d i n g、第65～66頁、1986；C a m p b e l l、第75～83頁、1984；各々は、本明細書中で参考として援用される）。例えば、免疫した動物がマウスである場合、P3-X63/Ag8、X63-Ag8.653、NS1/1. Ag 4 1、Sp210-Ag14、FO、NSO/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG1.7、およびS194/5XX0 Bu1が使用され得；ラットについて、R210. RCY3、Y3-Ag1.2.3、IR983F、4B210、または上記に列挙されたマウス細胞株のうちの1つが使用され得；そしてU-266、GM1500-GRG2、LICR-LOH-HMy2、およびUC729-6はすべて、ヒト細胞融合に関連して有用である。

#### 【0346】

抗体産生脾臓細胞または抗体産生リンパ節細胞、および骨髓腫細胞のハイブリッドを生成するための方法は、通常、細胞膜の融合を促進する因子（化学的または電氣的）の存在下で、4：1の比率で体細胞を骨髓腫細胞と混合する工程を包含するが、この比率はそれぞれ約20：1～約1：1まで変動し得る。センダイウイルスを使用する融合方法は、K o h l e rおよびM i l s t e i n（1975；1976；各々、本明細書中で参考として援用される）によって記載されており、そしてポリエチレングリコール（PEG）（例えば、37%（v/v）PEG）を使用する融合方法は、G e f f e rら（1977；本明細書中で参考として援用される）に記載されている。電氣的に誘導された融合方法の使用もまた適切である（G o d i n g、第71～74頁、1986；本明細書中で参考として援用される）。

#### 【0347】

融合手順は通常、低い頻度（約 $1 \times 10^{-6}$ ～ $1 \times 10^{-8}$ ）で生存可能なハイブ

リッドを生成する。しかし、これは問題を提起しない。なぜなら、生存可能な融合ハイブリッドは、選択培地中で培養することによって、親の非融合細胞（特に、通常は無限に分裂しつづける、非融合骨髓腫細胞）から識別されるからである。選択培地は、一般に、組織培養培地中でのヌクレオチドのデノボ合成をブロックする薬剤を含む培地である。例示的かつ好ましい薬剤は、アミノプテリン、メトトレキサート、およびアザセリンである。アミノプテリンおよびメトトレキサートは、プリンおよびピリミジンの両方のデノボ合成をブロックし、一方、アザセリンは、プリン合成のみをブロックする。アミノプテリンまたはメトトレキサートが使用される場合、ヌクレオチドの供給源としてヒポキサンチンおよびチミジンを培地に補充する（HAT培地）。アザセリンが使用される場合、ヒポキサンチンを培地に補充する。

#### 【0348】

好ましい選択培地は、HATである。ヌクレオチドサルベージ経路を機能し得る細胞のみが、HAT培地中で生存し得る。骨髓腫細胞は、サルベージ経路の重要な酵素（例えば、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPR T））を欠損し、そしてそれらは生存し得ない。B細胞はこの経路を機能し得るが、それらは培養中で限られた寿命を有し、そして一般に約2週間以内に死滅する。従って、選択培地中で生存し得る細胞のみが、骨髓腫細胞およびB細胞から形成されたそれらのハイブリッドである。

#### 【0349】

この培養は、特定のハイブリドーマが選択されるハイブリドーマの集団を提供する。代表的に、ハイブリドーマの選択は、マイクロタイタープレート中での単一クローン希釈によって細胞を培養し、次いで所望の抗VEGF反応性について個々のクローンの上清を試験すること（約2～3週間後）によって、実施される。このアッセイは、高感度で、単純で、そして迅速であるべきである（例えば、ラジオイムノアッセイ、酵素免疫検定法、細胞傷害性アッセイ、プラークアッセイ、ドット免疫結合アッセイ（dot immunobinding assay）など）。

#### 【0350】



次いで、選択されたハイブリドーマを段階希釈し、そして個々のVEGF抗体産生細胞株にクローン化する。次いで、このクローンは無限に増殖されて、MAbを提供する。細胞株は、2つの基本的様式でMAb産生のために利用され得る。ハイブリドーマのサンプルは、もともとの融合物のために体細胞および骨髓腫細胞を提供するために使用された型の組織適合性動物に注射（しばしば、腹腔腔内へ）され得る。この注射された動物は、融合された細胞ハイブリッドによって産生される特異的モノクローナル抗体を分泌する腫瘍を発症する。次いで、この動物の体液（例えば、血清または腹水）を穿刺して、高濃度でMAbを提供し得る。個々の細胞株はまた、インビトロで培養され得る。ここで、MAbは培養培地中に自然に分泌され、ここからMAbは高濃度で容易に獲得され得る。

#### 【0351】

いずれかの手段によって産生されたMAbは、一般に、例えば、濾過、遠心法、および種々のクロマトグラフィー方法（例えば、HPLCまたはアフィニティークロマトグラフィー）（これらの精製技術はすべて、当業者に周知である）を使用して、さらに精製される。これらの精製技術は各々、混合物の他の成分から所望の抗体を分離するための分別を含む。抗体の調製に特に適切な分析方法としては、例えば、プロテインA-Sepharoseクロマトグラフィーおよび／またはプロテインG-Sepharoseクロマトグラフィーが挙げられる。

#### 【0352】

（B6．ファージミドライブラリー由来の抗体）

組換え技術は、今や、一定範囲の抗体をコードする組換え遺伝子に由来する所望の特異性を有する抗体の調製を可能にしている（Van Dijkら、1989；本明細書中に参考として援用される）。特定の組換え技術は、免疫した動物の脾臓から単離されたRNAから調製されるコンビナトリアル免疫グロブリンファージ発現ライブラリーの免疫学的スクリーニングによる抗体遺伝子の単離を包含する（Morrisonら、1986；WinterおよびMilstein、1991；各々が本明細書中に参考として援用される）。

#### 【0353】

このような方法のために、コンビナトリアル免疫グロブリンファージミドライ

ブラリーは免疫した動物の脾臓から単離されたRNAから調製され、そして適切な抗体を発現するファージミドは、抗原を発現する細胞およびコントロール細胞を用いてパニングすることにより選択される。従来のハイブリドーマ技術を超えるこのアプローチの利点は、約 $10^4$ 倍もの多くの抗体が1回で生成およびスクリーニングされ得ること、ならびに新たな特異性がH鎖およびL鎖の組み合わせにより生成されることである。このことは、生成される適切な抗体の割合をさらに増大させる。

#### 【0354】

細菌中で、多様な抗体分子の大きなレパートリーを生成するための1つの方法は、ベクターとしてバクテリオファージ $\lambda$ を利用する(Huseら、1989; 本明細書中に参考として援用される)。 $\lambda$ ベクターを使用する抗体の生成は、DNA配列の重鎖および軽鎖集団を別々の開始ベクターへクローニングすることを包含する。このベクターは、引き続きランダムに組み合わせられて、抗体フラグメントを形成するために重鎖および軽鎖の同時発現を指向する単一のベクターを形成する。重鎖および軽鎖のDNA配列は、選択された抗原で免疫された動物に由来する脾臓細胞(またはそれらのハイブリドーマ)から単離されたmRNAの増幅により(好ましくは、PCR<sup>TM</sup>または関連増幅技術により)得られる。重鎖および軽鎖の配列は、代表的には、開始ベクターへの重鎖および軽鎖セグメントのクローニングを容易にするために、増幅されたDNAセグメントの末端に制限部位を組み込むプライマーを使用して増幅される。

#### 【0355】

完全にまたは部分的に合成的である抗体結合部位(すなわちパラトープ)の大きなライブラリーを作製およびスクリーニングするための別の方法は、糸状ファージ(例えば、M13、f1またはfd)に由来するディスプレイベクターを利用する。これらの糸状ファージディスプレイベクター(「ファージミド」ともいわれる)は、多様かつ新規な免疫特異性を有するモノクローナル抗体の大きなライブラリーを生じる。この技術は、糸状ファージ複製のアセンブリ段階の間に遺伝子産物および遺伝子を連結するための手段として、糸状ファージコートタンパク質膜アンカードメインを使用し、そしてこれは、コンビナトリアルライブラリ

一から抗体をクローニングおよび発現するために使用されている（K a n g ら、1991；B a r b a s ら、1991；各々が本明細書中に参考として援用される）。

#### 【0356】

糸状ファージディスプレイのためのこの一般的技術は、米国特許第5, 658, 727号（本明細書中に参考として援用される）に記載される。大部分の一般的認識において、この方法は、単一のベクター系を使用して、抗体遺伝子レパートリーから予め選択されたりガンドー結合特異性を同時クローニングおよびスクリーニングするための系を提供する。予め選択されたりガンドー結合能力についてライブラリーの単離されたメンバーをスクリーニングすることにより、ライブラリーに由来するメンバーをコードする遺伝子を単離するための簡便な手段を用いて、発現された抗体分子の結合能力の相関づけが可能になる。

#### 【0357】

発現およびスクリーニングの関連づけは、機能的抗体のアセンブリを可能にするための細菌細胞のペリプラズムへの融合ポリペプチドの標的化と、目的のライブラリーメンバーの簡便なスクリーニングを可能にするためのファージアセンブリの間の糸状ファージ粒子のコートへの融合タンパク質の標的化との組み合わせにより達成される。ペリプラズム標的化は、融合ポリペプチド中の分泌シグナルドメインの存在により提供される。ファージ粒子への標的化は、融合ポリペプチド中の糸状ファージコートタンパク質膜アンカードメイン（すなわち、c p I I I由来か、またはc p V I I I由来の膜アンカードメイン）の存在により提供される。

#### 【0358】

糸状ファージベースのコンビナトリアル抗体ライブラリーの多様性は、重鎖および軽鎖の遺伝子のシャッフリングにより、ライブラリーのクローニングされた重鎖遺伝子の1つ以上の相補性決定領域を改変することにより、または誤りがちな（e r r o r - p r o n e）ポリメラーゼ連鎖反応によりライブラリーヘランダム変異を導入することにより増大され得る。ファージミドライブラリーをスクリーニングするためのさらなる方法は、米国特許第5, 580, 717号；同第

5, 427, 908号;同第5, 403, 484号;および同第5, 223, 409号(各々が本明細書中に参考として援用される)に記載される。

#### 【0359】

大きなコンビナトリアル抗体ライブラリーをスクリーニングするための別の方法が開発され、この方法は、M13、f1またはfdのような糸状バクテリオファージの表面での多様な重鎖および軽鎖配列の集団の発現を利用する(米国特許第5, 698, 426号;本明細書中に参考として援用される)。多様な重鎖(Hc)および軽鎖(Lc)配列の2つの集団は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR<sup>TM</sup>)により合成される。これらの集団は、発現のために必要なエレメントを含む、別個のM13ベースのベクターにクローニングされる。重鎖ベクターは、重鎖配列の翻訳がgV I I I-Hc融合タンパク質を生成するように、遺伝子V I I I (gV I I I) コートタンパク質配列を含む。2つのベクターの集団は、HcおよびLcの配列を含むベクター部分のみが単一の環状ベクターに連結されるように、ランダムに組み合わせられる。

#### 【0360】

組み合わせられたベクターは、M13での2つのポリペプチドのアセンブリおよび表面発現のためにHcおよびLcの配列の両方の同時発現を指向する(米国特許第5, 698, 426号;本明細書中に参考として援用される)。組み合わせ工程は、単一のベクターに2つの多様な集団内の異なるHcコード配列およびLcコード配列をランダムに結びつける。各々の独立したベクターから与えられたこのベクター配列は、生存ファージの生成のために必要である。さらに、擬gV I I I配列は2つの開始ベクターのうち的一方のみに含まれるので、Lc会合gV I I I-Hc融合タンパク質としての機能的抗体フラグメントの同時発現は、ベクター配列が単一のベクター内に連結されるまではファージ表面で達成され得ない。

#### 【0361】

抗体ライブラリーの表面発現は、アンバーサプレッサー株において行われる。Hc配列とgV I I I配列との間のアンバー停止コドンは、非サプレッサー株において2つの成分を連結しない。非サプレッサー株から生成されたファージを単

離し、そしてサプレッサー株を感染させることは、発現の間に、g V I I I 配列にH c 配列を連結させる。感染後にサプレッサー株を培養することは、g V I I I 融合タンパク質（g V I I I -F a b 融合タンパク質）としてライブラリー内の全ての抗体種をM 1 3 フェージの表面で同時発現させることを可能にする。あるいは、このD N A は、非サプレッサー株から単離され得、次いで、同じ効果を達成するようにサプレッサー株に導入され得る。

### 【0362】

表面発現ライブラリーは、標準的アフィニティー単離手順により予め選択された分子を結合する特異的F a b フラグメントについてスクリーニングされる。このような方法としては、例えば、パニング（P a r m l e y およびS m i t h、1988；本明細書中に参考として援用される）、アフィニティークロマトグラフィーおよび固相ブロッキング手順が挙げられる。パニングは、高力価のフェージが容易に、迅速かつ少容量でスクリーニングされ得るので好ましい。さらに、この手順は、集団内の微量なF a b フラグメント種を選択し得る。この微量のフラグメント種は、他の方法では検出不能であり、そして実質的に均質な集団にまで増殖されない。選択されたF a b フラグメントは、このフェージ集団の増殖後に、ポリペプチドをコードする核酸を配列決定することにより特徴づけられ得る。

### 【0363】

抗体の多様なライブラリーを作製し、所望の結合特異性についてスクリーニングするための別の方法は、米国特許第5,667,988号および同第5,759,817号（各々が、本明細書中に参考として援用される）に記載される。この方法は、免疫グロブリン可変重鎖および可変軽鎖の可変ドメインのC D R 領域に縮重、ならびにフェージミドの表面での変異誘発したポリペプチドのディスプレイを組み込むために、縮重オリゴヌクレオチドおよびプライマー伸長反応を用いるフェージミドライブラリーの形態での、ヘテロダイマーの免疫グロブリン分子のライブラリーの調製を包含する。それ以降、ディスプレイタンパク質は、予め選択された抗原に結合する能力についてスクリーニングされる。

### 【0364】

ヘテロダイマー免疫グロブリン分子を生成するための方法は、一般に、（１）目的の重鎖または軽鎖のV領域コード遺伝子をファージミドディスプレイベクターに導入すること；（２）無作為化された結合部位をファージミドディスプレイタンパク質ベクターへ、抗体V領域遺伝子のCDRに対する相同性の領域を含み、そして無作為化したコード配列を生成するための縮重領域を含むオリゴヌクレオチドでのプライマー伸長により導入して、各々がファージミド表面ディスプレイタンパク質上に提示される異なる推定結合部位を発現し得るディスプレイベクターの大きな集団を形成すること；（３）糸状ファージ粒子の表面でディスプレイタンパク質および結合部位を発現させること；ならびに（４）アフィニティー技術（例えば、予め選択された抗原に対するファージ粒子のパニング）を用いて表面発現したファージ粒子を単離（スクリーニング）し、このことによって、予め選択された抗原に結合する結合部位を含むディスプレイタンパク質を含む１種以上のファージミドを単離することを包含する。

#### 【0365】

抗体の多様なライブラリーを作製し、そして所望の結合特異性についてスクリーニングするためのこの方法のさらなるバリエーションは、米国特許第5,702,892号（本明細書中に参考として援用される）に記載される。この方法においては、重鎖配列のみが用いられ、この重鎖配列は、CDRI超可変領域またはCDRII超可変領域のいずれかをコードする全てのヌクレオチド位置で無作為化され、そしてCDRにおける遺伝的可変性は、任意の生物学的プロセスとは独立して生成される。

#### 【0366】

この方法において、2つのライブラリーを操作して、重鎖遺伝子構造の骨格内のオリゴヌクレオチドモチーフを遺伝的にシャッフルする。CDRIまたはCDRIIのいずれかのランダム変異によって、重鎖遺伝子の超可変領域は、高度に多様な配列の収集物を生じるように再構築された。変異した遺伝子配列の収集物によりコードされる重鎖タンパク質は、2つの免疫グロブリン鎖の一方のみを必要とするが、免疫グロブリンの結合特性の全てを有する潜在能力を保有した。

#### 【0367】

詳細には、この方法は、免疫グロブリン軽鎖タンパク質の非存在下で行われる。改変した重鎖タンパク質を提示するファージライブラリーは、固定化されたりガンドとともにインキュベートされて、固定化されたりガンドに特異的に結合する組換えタンパク質をコードするクローンが選択される。次いで、結合したファージを固定化されたりガンドから解離し、そして細菌宿主細胞中での増殖により増幅させる。個々のウイルスプラーク（各々が異なる組換えタンパク質を発現する）は拡大され、次いで、個々のクローンは結合活性についてスクリーニングされ得る。

#### 【0368】

##### (B7. ヒトリンパ球由来の抗体)

インビトロ免疫、または抗原刺激をまた使用して、ヒト抗VEGF抗体を生成し得る。このような技術を使用して、正常な健全な被験体由来の末梢血リンパ球を単にインビトロにおいてVEGFで抗体産生細胞を刺激することにより刺激し得る。このような「インビトロ免疫」は、一般的に、リンパ球の混合集団（混合リンパ球培養物、MLC）中での非免疫Bリンパ球の抗原特異的活性化を含む。インビトロ免疫はまた、B細胞増殖因子およびB細胞分化因子ならびにリンホカインにより支持され得る。これらの方法により産生される抗体は、しばしば、IgM抗体である（Borrebaeckら、1986；本明細書中に参考として援用される）。

#### 【0369】

別の方法が記載され（米国特許第5,681,729号、本明細書中に参考として援用される）、ここで、主にIgG（またはIgA）抗体を産生するヒトリンパ球が得られ得る。この方法は、一般的な意味において、免疫不全動物へヒトリンパ球を移植し、その結果、ヒトリンパ球が動物の身体内に「取りこまれ」；抗原に特異的な抗体を産生するヒトリンパ球を生成するように所望の抗原を用いて動物を免疫し；そして動物から抗体を産生するヒトリンパ球を回収する工程を包含する。従って、産生されたヒトリンパ球を使用して、抗体を産生するヒトリンパ球を不死化し、抗体を産生する得られた不死化ヒト起源リンパ球をクローニングし、そしてクローニングされた不死化ヒト起源リンパ球から所望の抗原に特

異的なモノクローナル抗体を回収することによりモノクローナル抗体を産生し得る。

#### 【0370】

この技術において使用され得る免疫不全動物は、動物にヒトリンパ球が移植された場合に拒絶を示さない免疫不全動物である。このような動物は、物理的、化学的、または生物学的な処置により人工的に調製され得る。任意の免疫不全動物が使用され得る。ヒトリンパ球は、ヒト末梢血、脾臓、リンパ節、扁桃腺などから得られ得る。

#### 【0371】

動物における移植されたヒトリンパ球の「取りこみ」は、単に動物にヒトリンパ球を投与することにより達成され得る。投与経路は制限されず、そして例えば、皮下、静脈内、または腹腔内であり得る。ヒトリンパ球の用量は制限されず、そして通常は、動物あたり  $10^6 \sim 10^8$  のリンパ球であり得る。次いで、免疫不全動物は、所望のVEGF抗原で免疫される。

#### 【0372】

免疫後、ヒトリンパ球が、任意の慣習的な方法により、血液、脾臓、リンパ節または他のリンパ組織から回収される。例えば、単核細胞は、Ficoll-Hypaque（比重：1.077）遠心法により分離され得、そしてプラスチックディッシュ吸着法により単球が回収され得る。免疫不全動物由来の夾雑細胞は、動物細胞に特異的な抗血清を用いることにより取り除かれ得る。抗血清は、例えば、免疫不全動物の脾臓細胞で第2の異なる動物を免疫し、そして異なる免疫動物から血清を回収することにより得られ得る。抗血清での処置は、任意の段階で実施され得る。ヒトリンパ球はまた、マーカーとして、細胞表面上で発現されるヒト免疫グロブリンを使用する免疫学的方法により回収され得る。

#### 【0373】

これらの方法により、一つ以上の選択されたVEGFエピトープに特異的なIgG抗体およびIgA抗体を主に産生するヒトリンパ球が得られ得る。次いで、モノクローナル抗体が、不死化、選択、細胞増殖、および抗体産生によりヒトリンパ球から得られる。



## 【0374】

(B8. ヒト抗体ライブラリーを含有するトランスジェニックマウス)

組換え技術は、今や抗体の調製のために利用可能である。上記に開示される組換え免疫グロブリンファージ発現ライブラリーに加えて、別の分子クローニングアプローチは、抗体をヒト抗体ライブラリーを含有するトランスジェニックマウスから調製することである。このような技術は、米国特許第5, 545, 807号に記載され、これは、本明細書に参考として援用される。

## 【0375】

最も一般的な意味において、これらの方法は、その生殖系統に、ヒト起源の免疫グロブリンの少なくとも一部をコードする遺伝子材料か、または免疫グロブリンのレパートリーをコードするように再編成され得る遺伝子材料を挿入したトランスジェニック動物の産生を包含する。挿入された遺伝子材料は、ヒト供給源から産生され得るか、または合成により産生され得る。その材料は、公知の免疫グロブリンの少なくとも一部をコードし得るか、または改変された免疫グロブリンの少なくとも一部をコードするように改変され得る。

## 【0376】

挿入された遺伝子材料は、トランスジェニック動物において発現され、挿入されたヒト免疫グロブリン遺伝子材料に少なくとも部分的に由来する免疫グロブリンを産生する。その遺伝子材料は、たとえ、その挿入された遺伝子材料が、生殖系列の誤った位置に、または誤った相対位置に組み込まれたとしても、その一部が挿入された遺伝子材料に由来する免疫グロブリンのレパートリーが、産生され得るように、トランスジェニック動物において再編成されることが見出される。

## 【0377】

その挿入された遺伝子材料は、プラスミドおよび／またはコスミドのような原核生物ベクターにクローン化されたDNAの形態であり得る。より大きなDNAフラグメントは、酵母人工染色体ベクターを使用して(Burkeら、1987; 本明細書中に参考として援用される)、または染色体フラグメントを導入することにより(RicherおよびLo、1989; 本明細書中に参考として援用される)挿入される。その挿入された遺伝子材料は、従来の様式で宿主に(例え

ば、注入によって、または他の手順によって、受精卵または胚性幹細胞に) 導入され得る。

#### 【0378】

好ましい局面において、得られるトランスジェニック動物が、免疫グロブリンを産生するときに、挿入されたヒト遺伝子材料のみを使用するように、免疫グロブリン定常領域をコードする遺伝子材料をはじめから保有しない宿主動物が利用される。これは、関連する遺伝子材料を欠失する天然に存在する変異体宿主を使用して、または人工的に、例えば、細胞株で、関連する遺伝子材料が除去されている宿主を究極的に作製するために、変異体を作製することによってのいずれかで、達成され得る。

#### 【0379】

宿主動物が免疫グロブリン定常領域をコードする遺伝子材料を保有する場合、トランスジェニック動物は、天然に存在する遺伝子材料および挿入された遺伝子材料を保有し、そして天然に存在する遺伝子材料、挿入された遺伝子材料、および両方のタイプの遺伝子材料の混合物に由来する免疫グロブリンを産生する。この場合、その所望の免疫グロブリンは、トランスジェニック動物に由来するハイブリドーマを、例えば、抗体遺伝子発現の対立遺伝子排除の現象または示差的染色体損失を利用して、スクリーニングすることによって得られ得る。

#### 【0380】

一旦適切なトランスジェニック動物が調製されると、その動物は、所望の免疫原で単に免疫される。挿入される材料の性質に依存して、その動物は、外来起源のその遺伝子材料が、免疫グロブリンの一部のみをコードする場合、例えば、混合されたマウス/ヒト起源のキメラ免疫グロブリンを産生し得る；または、その動物は、外来起源の遺伝子材料が、免疫グロブリン全体をコードする場合、完全に外来の免疫グロブリン（例えば、完全にヒト起源の）を産生し得る。

#### 【0381】

ポリクローナル抗血清は、免疫に続いて、トランスジェニック動物から産生され得る。免疫グロブリン産生細胞は、目的の免疫グロブリンを産生する動物から除去され得る。好ましくは、モノクローナル抗体は、トランスジェニック動物か

ら、例えば、その動物由来の脾臓細胞を骨髓腫細胞と融合し、そして得られるハイブリドーマをスクリーニングして所望の抗体を産生するものを選択することによって、産生される。このようなプロセスのための適切な技術は、本明細書に記載される。

#### 【0382】

代替のアプローチにおいて、その遺伝子材料は、所望の抗体が、動物の血清のような体液、またはミルク、初乳もしくは唾液のような外部分泌液において産生されるような様式で、動物に組み込まれ得る。例えば、インビトロでヒト免疫グロブリンの少なくとも一部をコードする遺伝子材料を、ミルクタンパク質をコードする哺乳動物の遺伝子に挿入し、次いで、その遺伝子をその哺乳動物の受精卵に、例えば、注入により、導入することによって、その卵は、挿入されたヒト免疫グロブリン遺伝子材料に少なくとも部分的に由来する免疫グロブリンを含有するミルクを産生する成体雌哺乳動物に成長し得る。次いで、所望の抗体は、ミルクから回収され得る。このようなプロセスを行うための適切な技術は、当業者に公知である。

#### 【0383】

上記のトランスジェニック動物は、通常、単一のアイソタイプの、より詳細にはB細胞成熟に必須であるアイソタイプ（例えば、IgMおよびIgD）のヒト抗体を産生するために利用される。ヒト抗VEGF抗体を産生するための別の好ましい方法は、米国特許第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,611,016号；および同第5,770,429号（各々が本明細書に参考として援用される）に記載される技術を使用することである。そこでは、B細胞発生のために必要とされるアイソタイプから他のアイソタイプへ変換し得るトランスジェニック動物が記載される。

#### 【0384】

Bリンパ球の発生において、その細胞は、まず生産的に再編成されたV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>領域によって決定される結合特異性を有するIgMを産生する。その結果、各B細胞およびその子孫細胞は、同じLおよびH鎖V領域を有する抗体を合成

するが、これらは、H鎖のアイソタイプを交換し得る。ミューまたはデルタ定常領域の使用は、交互のスプライシングによって大部分決定され、IgMおよびIgDが、単一の細胞において同時発現されることを可能にする。他の重鎖アイソタイプ（ $\gamma$ 、 $\alpha$ 、および $\epsilon$ ）は、遺伝子再編成事象が、CミューエキソンおよびCデルタエキソンを削除した後に、天然においてのみ発現される。この遺伝子の再編成プロセスは、アイソタイプスイッチングと呼ばれ、代表的には、各重鎖遺伝子のすぐ上流に位置する（デルタを除く）いわゆるスイッチセグメント間の組換えによって生じる。個々のスイッチセグメントは、2 kbと10 kbとの間の長さであり、そして主に短い反復した配列からなる。

#### 【0385】

これらの理由により、導入遺伝子は、転写調節配列を、アイソタイプスイッチングに利用されるべき各スイッチ領域の約1～2 kb上流内に組み込んでいることが好ましい。これらの転写調節配列は、好ましくは、プロモーターおよびエンハンサーエレメントを含み、そしてより好ましくは、スイッチ領域に天然に結合する（すなわち、生殖系統の構成において生じる）5' 隣接（すなわち、上流）領域を含む。1つのスイッチ領域からの5' 隣接配列は、導入遺伝子構築のために異なるスイッチ領域に作動可能に連結され得るが、いくつかの実施形態では、導入遺伝子構築物に組み込まれている各スイッチ領域は、天然に存在する生殖系統構成においてすぐ上流に存在する5' 隣接領域を有することが好ましい。免疫グロブリンスイッチ領域配列に関連する配列情報は、公知である（Millsら、1990；Siderasら、1989；各々、参考として本明細書に援用される）。

#### 【0386】

米国特許第5, 545, 806号；同第5, 569, 825号；第5, 625, 126号；第5, 633, 425号；第5, 661, 016号；および第5, 770, 429号に記載される方法では、トランスジェニック動物内に含まれるヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、アイソタイプのスイッチングに至るB細胞発達の経路を通じて正確に機能する。従って、この方法では、これらの導入遺伝子は、アイソタイプスイッチングおよび以下の1つ以上を生成するように構築され

る：（１）高レベルおよび細胞型特異的発現、（２）機能的遺伝子再配置、（３）対立遺伝子排除の活性化および対立遺伝子排除に対する応答、（４）十分な一次レパートリーの発現、（５）シグナル伝達、（６）体細胞過剰変異、および（７）免疫応答の間の導入遺伝子抗体遺伝子座の支配。

#### 【0387】

導入遺伝子機能に対する重要な要件は、広範な範囲の抗原に対する二次免疫応答の引金となるために十分に多様性である一次抗体レパートリーの生成である。再配置された重鎖遺伝子鎖は、各々がいくつかのエキソンによりコードされる、シグナルペプチドエキソン、可変領域エキソンおよび多ドメイン定常領域の領域のタンデムアレイからなる。これらの定常領域遺伝子の各々は、異なるクラスの免疫グロブリンの定常部分をコードする。B細胞発達の際に、V領域近位定常領域は欠失し、新たな重鎖クラスの発現に至る。各重鎖クラスについて、RNAスプライシングの選択的パターンが、膜貫通免疫グロブリンおよび分泌された免疫グロブリンの両方を生じる。

#### 【0388】

ヒト重鎖遺伝子座は、2 Mbにまたがるほぼ200 V遺伝子セグメント、約40 kbにまたがるほぼ30 D遺伝子セグメント、3 kb内のクラスターである6つのJセグメント、およびほぼ300 kbにわたって広がる9つの定常領域遺伝子セグメントからなる。全長遺伝子座は、第14染色体の長腕の遠位部分のほぼ2.5 Mbにまたがる。6つの公知のV<sub>H</sub>ファミリーのすべてのメンバー、DおよびJ遺伝子セグメント、ならびに $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 1$ および $\alpha 1$ 定常領域を含む重鎖導入遺伝子フラグメントは公知である（Bermanら、1988；参考として本明細書に援用される）。すべての必要な遺伝子セグメントおよびヒト軽鎖遺伝子座からの調節配列を含むゲノムフラグメントもまた同様に構築される。

#### 【0389】

首尾良く再配置された免疫グロブリン重鎖および軽鎖導入遺伝子の発現は、通常、トランスジェニック非ヒト動物において内因性免疫グロブリン遺伝子の再配置を抑制することによって優性効果を有する。しかし、特定の実施形態では、例

えば、導入遺伝子と内因性 I g 配列との間のトランススイッチングにより、ヒト可変領域および非ヒト（例えばマウス）定常領域を含むハイブリッド免疫グロブリン鎖が形成され得ないように、内因性 I g 遺伝子座の完全不活性化を行うことが所望される。胚性幹細胞技術および相同的組換えを用い、内因性免疫グロブリンレパートリーを容易に排除し得る。さらに、内因性 I g 遺伝子の抑制は、アンチセンス技法のような種々の技法を用いて達成され得る。

### 【0390】

本発明の他の局面では、トランススイッチされた免疫グロブリンを生成することが所望され得る。このようなキメラトランススイッチ免疫グロブリンを含む抗体は、例えば、宿主細胞においてエフェクター機能の保持のために、非ヒト（例えばマウス）定常領域を有することが所望される種々の適用のために用いられ得る。マウス定常領域の存在は、ヒト定常領域に比べ、例えば、このようなキメラ抗体がマウス疾患モデルにおいて試験され得るように、マウスエフェクター機能（例えば、ADCC、マウス補体固定化）を提供するという利点を与え得る。動物試験の次に、ヒト可変領域コード配列が、例えば、PCR<sup>TM</sup>増幅または供給源（ハイブリドーマクローン）からのcDNAクローニングにより単離され、そしてヒト治療使用により適切なヒト配列抗体をコードするための所望のヒト定常領域をコードする配列にスプライスされ得る。

### 【0391】

#### （B9. ヒト化抗体）

一般に、ヒト抗体は、ヒト治療における使用に少なくとも3つの可能な利点を有する。第1に、そのエフェクター部分はヒトであるので、例えば、補体依存性細胞傷害性（CDC）または抗体依存性細胞傷害性（ADCC）によって標的細胞をより効率的に破壊するために、ヒト免疫系の他の部分とより良好に相互作用し得る。第2に、ヒト免疫系は、異物として抗体を認識しない。第3に、ヒト循環中の半減期は、天然に存在するヒト抗体と類似であり、より少なくかつより少ない用量を与えることを可能にする。

### 【0392】

ヒト抗VEGF抗体を調製する種々の方法が本明細書中に提供される。ヒト抗

体に加えて、「ヒト化」抗体は多くの利点を有する。「ヒト化」抗体は、一般に、ヒト定常および／または可変領域ドメインまたは特定の変更を保持する、マウス、ラット、ハムスター、ウサギまたはその他の種からのキメラまたは変異体モノクローナル抗体である。いわゆる「ヒト化」抗VEGF抗体を生成するための技法は、当業者に周知である。

#### 【0393】

ヒト化抗体もまた、先行する利点を共有する。第1に、エフェクター部分はなおヒトである。第2に、ヒト免疫系は、フレームワークまたは定常領域を異物として認識せず、そしてそれ故、このような注入抗体に対する抗体応答は、完全に異物であるマウス抗体に対してより少ない。第3に、注入されたヒト化抗体は、注入されたマウス抗体とは反対に、天然に存在するヒト抗体により類似する半減期を有し、またより少なくかつより少ない頻度の用量を与える。

#### 【0394】

ヒト化抗体を産生する多くの方法が記載されている。新たな人工タンパク質分子または「キメラ」抗体を形成するための、タンパク質ジスルフィド結合を通じて連結される抗体ドメインの制御された再配置が利用され得る（Koniecznyら、1981；本明細書中に参考として援用される）。組換えDNA技術もまた、マウス抗体可変軽鎖および重鎖ドメインと、ヒト抗体軽鎖および重鎖定常ドメインとをコードするDNA配列間の遺伝子融合を構築するために用いられ得る（Morrisonら、1984；本明細書中に参考として援用される）。

#### 【0395】

マウスモノクローナル抗体の抗原結合部分または相補性決定領域（CDR）をコードするDNA配列を、ヒト抗体重鎖および軽鎖のフレームワークをコードするDNA配列中に分子手段により挿入し得る（Reichmannら、1988）。発現された組換え産物は、「新形態」またはヒト化抗体と呼ばれ、そしてヒト抗体軽鎖または重鎖およびマウスモノクローナル抗体の抗原認識部分であるCDRのフレームワークを含む。

#### 【0396】

ヒト化抗体を生成する別の方法が、米国特許第5,639,641号に記載さ

れ、本明細書中に参考として援用される。この方法は、再現により、可変領域においてヒト表面の提示に起因する改良された治療効力を有するヒト化げっ歯類抗体を提供する。この方法では：（１）抗体重鎖および軽鎖可変領域のプールの位置アラインメントを生成し、重鎖および軽鎖可変領域フレームワーク表面曝露位置のセットを与える。ここで、すべての可変領域に対するアラインメント位置は、少なくとも約98%同一である；（２）重鎖および軽鎖可変領域フレームワーク表面曝露アミノ酸残基のセットがげっ歯類抗体（またはそのフラグメント）に対して規定される；（３）このげっ歯類表面曝露アミノ酸残基のセットに最も近接して同一である、重鎖および軽鎖可変領域フレームワーク表面曝露アミノ酸残基のセットが同定される；（４）工程（２）で規定された重鎖および軽鎖可変領域フレームワーク表面曝露アミノ酸残基のセットが、げっ歯類抗体の相補性決定領域の任意の残基の任意の原子の5 Å内にあるようなアミノ酸残基を除いて、工程（３）で同定された重鎖および軽鎖可変領域フレームワーク表面曝露アミノ酸残基のセットで置換される；および（５）結合特異性を有するヒト化げっ歯類抗体が産生される。

### 【0397】

ヒト化抗体の産生についての類似の方法は、米国特許第5,693,762号；同第5,693,761号；同第5,585,089号；および同第5,530,101号（各々が本明細書中で参考として援用される）に記載される。これらの方法は、1以上の相補性決定領域（CDR）およびドナー免疫グロブリンに由来するさらなるアミノ酸ならびに受け入れているヒト化免疫グロブリンに由来するフレームワーク領域を有するヒト化免疫グロブリンを産生することを包含する。各々のヒト化免疫グロブリン鎖は、通常、CDRに加えて、ドナー免疫グロブリン中のCDRに直接隣接する1以上のアミノ酸または分子モデリングにより推定される約3 Å以内の1以上のアミノ酸のような、CDRと相互作用して結合親和性をもたらし得るドナー免疫グロブリンフレームワークに由来するアミノ酸を含む。重鎖および軽鎖は、米国特許第5,693,762号；同第5,693,761号；同第5,585,089号；および同第5,530,101号（各々が本明細書中で参考として援用される）に記載される種々の位置基準の、いず



れか1つ、任意の組合せ、または全てを使用することによって、各々設計され得る。インタクトな抗体に組み合わされる場合、ヒト化免疫グロブリンは、ヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、そして本来の抗原に対するドナー免疫グロブリンと実質的に同じ親和性を保持する。

#### 【0398】

ヒト化抗体を産生するためのさらなる方法は、米国特許第5, 565, 332号および同第5, 733, 743号（各々が本明細書中で参考として援用される）に記載される。この方法は、抗体をヒト化する概念を、本明細書中にもまた詳細に記載されるファージミドライブラリーと組み合わせる。一般的な意味では、この方法は、目的の抗原に対する抗体または抗体の集団の抗原結合部位に由来する配列を利用する。従って、単一のげっ歯類抗体について、抗体の抗原結合部位の部分を含む配列は、組み合わせて完全な抗原結合部位を作製し得るヒト抗体の配列の多様なレパートリーと組み合わせられ得る。

#### 【0399】

このプロセスにより作製される抗原結合部位は、本来のげっ歯類抗体の配列の部分のみが同様の様式にて抗原と接触するようであるという点で、CDRグラフトイング（grafting）により作製される抗原結合部位とは異なる。選択されたヒト配列は、配列において異なるようであり、そして本来の結合部位のそれらからの抗原と代替的に接触する。しかし、抗原に対する本来の配列の部分の結合ならびに抗原およびその抗原結合部位の形状により課される制約は、抗原の同じ領域またはエピトープに対するヒト配列の新たな接触を駆動するようである。従って、このプロセスは、「エピトープインプリント選択」（EIS）と呼ばれている。

#### 【0400】

動物の抗体で開始して、1つのプロセスは、部分的にヒト抗体である抗体の選択を生じる。このような抗体は、治療において直接的にまたは少数の重要な残基の変更の後に使用されるべきヒト抗体と配列において十分に類似し得る。ヒト配列を有する選択された抗体のげっ歯類成分の間の配列の差異は、例えば、個々の残基の部位特異的変異誘発によってか、またはループ全体のCDRグラフトイン

グによって、ヒト配列の残基で異なる残基を置換することによって最小化され得る。しかし、完全なヒト配列を有する抗体もまた、作製され得る。従って、E I Sは、それぞれ、動物または部分的なヒト抗体と同じエピトープに結合する部分的なヒト抗体またはそれぞれ、動物または部分的なヒト抗体と同じエピトープに結合する完全なヒト抗体を作成するための方法を提供する。E I Sにおいて、抗体フラグメントのレパートリーは、糸状ファージの表面上に提示され得、そして抗原結合活性を有するフラグメントをコードする遺伝子は、抗原へのファージの結合によって選択され得る。

#### 【0401】

本発明の使用に意図される抗体をヒト化するためのさらなる方法は、米国特許第5,750,078号；同第5,502,167号；同第5,705,154号；同第5,770,403号；同第5,698,417号；同第5,693,493号；同第5,558,864号；同第4,935,496号；および同第4,816,567号（各々は、本明細書中で参考として援用される）に記載される。WO98/45331およびWO98/45332は、特に有益であり、かつ抗VEGF抗体に適用される場合のヒト化の原理をさらに例示するために、本明細書中で参考として援用される。

#### 【0402】

(B10. PCR<sup>TM</sup> による変異誘発)

部位特異的変異誘発は、基礎となるDNAの特異的な変異誘発を通して、個々の抗体の調製において有用な技術である。この技術はさらに、ヒト化しようとしなかりと、DNA内に1以上のヌクレオチド配列の変化を導入することによって、1以上の前述の考慮を援用して、配列改変体を調製および試験するすばやい能力を提供する。

#### 【0403】

多くの方法が、変異誘発における使用について適切であるが、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR<sup>TM</sup>）の使用は、一般的に現在好ましい。この技術は、所定のDNA配列中に所望の変異を導入するための迅速かつ効率的な方法を提供する。以下のテキストは、所定の配列によってコードされるアミノ酸を変えるために使用さ

れ得るような、配列中に点変異を導入するPCR<sup>TM</sup>の使用を特に記載する。この方法の適応もまた、DNA分子中に制限酵素部位を導入するために適切である。

#### 【0404】

この方法において、合成オリゴヌクレオチドは、増幅したセグメントの一方の端に点変異を組み込むために設計される。PCR<sup>TM</sup>の後に、増幅したフラグメントは、クレノーフラグメントで処理することによって、平滑末端にされ、次いで、この平滑末端フラグメントは、配列分析を容易にするためにベクター中に連結され、そしてサブクローニングされる。

#### 【0405】

変異誘発することを所望するテンプレートのDNAを調製するために、このDNAは、高コピー数のベクター（例えば、pUC19）中に、変異される領域に隣接する制限部位を使用して、サブクローニングされる。次いで、テンプレートのDNAは、プラスミドのミニプレップを使用して調製される。親配列に基づくが、所望の点変異を含みかつ制限酵素部位によってその5'末端に隣接される、適切なオリゴヌクレオチドプライマーが、自動化合成機を使用して合成される。約15塩基程度のテンプレートDNAに相同なプライマーが、一般に必要とされる。プライマーは、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製され得るが、これは、PCR<sup>TM</sup>の使用について絶対に必要ではない。次いで、このオリゴヌクレオチドの5'末端は、リン酸化されるべきである。

#### 【0406】

このテンプレートDNAは、所望の点変異を含むオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、PCR<sup>TM</sup>によって増幅されるべきである。増幅緩衝液中のMgCl<sub>2</sub>の濃度は、一般に約15mMである。一般に、約20～25サイクルのPCR<sup>TM</sup>が、以下の通りに実行されるべきである：95℃にて35秒の変性；50℃にて2分のハイブリダイゼーション；および72℃にて2分の伸長。PCR<sup>TM</sup>は、一般に、72℃での約10分間の最後のサイクルの伸長を含む。最後の伸長工程の後に、約5ユニットのクレノーフラグメントが、反応混合物に添加され、約30℃にてさらに15分間インキュベートされるべきである。クレノーフラグメントのエキソヌクレアーゼ活性は、末端を平らにし、そして平滑末端クローニン

グに適切にするために必要とされる。

#### 【0407】

得られた反応混合物は、一般に、この増幅が推定される産物を生じたことを確認するために、非変性アガロースまたはアクリルアミドゲル電気泳動によって分析されるべきである。次いで、大部分のミネラルオイルを除去し、クロロホルムで抽出して残っているオイルを除去し、緩衝化フェノールで抽出し、次いで100%エタノールを用いる沈澱により濃縮することによって、反応混合物を処理する。次に、このオリゴヌクレオチドに使用された隣接配列で切断する制限酵素を用いて増幅したフラグメントのおよそ半分を消化するべきである。この消化したフラグメントは、低ゲル化／融点アガロースゲル上にて精製される。

#### 【0408】

このフラグメントをサブクローニングするため、そして点変異を調べるために、平滑末端のライゲーションによって、適切に消化されたベクター中に2つの増幅したフラグメントをサブクローニングする。これは、ミニプレップを使用して、プラスミドDNAが引き続き調製され得るE. coliを形質転換するために使用される。次いで、プラスミドDNAの増幅した部分は、正確な点変異が作製されたことを確認するためにDNA配列決定によって分析される。Taq DNAポリメラーゼは、DNAフラグメント中にさらなる点変異を導入するので、これは、重要である。

#### 【0409】

点変異の導入はまた、一連のPCR<sup>TM</sup>工程を使用してもたらされ得る。この手順において、この変異を含む2つのフラグメントは、互いにアニールされ、そして相互に開始する合成によって伸長される。次いで、このフラグメントは、第2のPCR<sup>TM</sup>工程によって増幅され、それによって上記のプロトコルに必要とされる平滑末端のライゲーションを回避する。この方法において、テンプレートDNAの調製、オリゴヌクレオチドプライマーの作製および第1のPCR<sup>TM</sup>増幅は、上記のように実行される。しかし、このプロセスにおいて、選択されたオリゴヌクレオチドは、約15～約20個の間の塩基のストレッチについてテンプレートDNAと相同なはずであり、そしてまた約10塩基以上だけで互いに重複しなけ

ればならない。

【0410】

第2のPCR<sup>TM</sup>増幅において、上記の条件を使用して、各々の増幅したフラグメントおよび各々の隣接する配列プライマーを使用して、そして約20～約25の間のサイクルについてPCR<sup>TM</sup>を実行する。再度、このフラグメントをサブクローニングし、そして上記に概説した工程を使用して点変異が正確であったことを調べる。

【0411】

前述の方法のいずれかを使用して、可能な限り小さなフラグメントを増幅することによって、変異を導入することが、一般に好ましい。もちろん、パラメータ（例えば、GC含量およびこのオリゴの長さによって一般に影響される、オリゴヌクレオチドの融解温度）はまた、注意深く考慮されるべきである。これらの方法の実行、および必要な場合、それらの最適化は、当業者に公知であり、そして本明細書中に参考として援用される、種々の刊行物（例えば、Current Protocols in Molecular Biology、1995）にさらに記載される。

【0412】

部位特異的変異誘発を実行する場合に、表Aは、参考として用いられ得る。

【0413】

【表1】

表 A

アミノ酸	コドン						
アラニン	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU	
システイン	Cys	C	UGC	UGU			
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAU			
グルタミン酸	Glu	E	GAA	GAG			
フェニルアラニン	Phe	F	UUC	UUU			
グリシン	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU	
ヒスチジン	His	H	CAC	CAU			
イソロイシン	Ile	I	AUA	AUC	AUU		
リジン	Lys	K	AAA	AAG			
ロイシン	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG CUU
メチオニン	Met	M	AUG				
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU			
プロリン	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU	
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAG			
アルギニン	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG CGU
セリン	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG UCU
トレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU	
バリン	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU	
トリプトファン	Trp	W	UGG				
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU			

## 【0414】

## (B11. 抗体フラグメントおよび誘導体)

本来のVEGFR2遮断抗VEGF抗体の供給源とは無関係に、インタクトな抗体、抗体マルチマー、または抗体の種々の機能的な抗原結合領域のいずれか1つは、本発明において使用され得る。例示的な機能領域は、抗VEGF抗体のscFv、Fv、Fab'、FabおよびF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを含む。このような構築物を調製するための技術は、当業者に周知であり、そして本明細書中にてさらに例示される。

## 【0415】

抗体構築物の選択は、種々の因子によって影響され得る。例えば、延長した半減期は、腎臓内のインタクトな抗体の能動的な再吸収（免疫グロブリンのFc片の特性）から生じ得る。従って、IgGベースの抗体は、それらのFab' 対応物よりも遅い血中クリアランスを示すことが予測される。しかし、Fab' フラグメントベースの組成物は、一般に、より良好な組織浸透能力を示す。

## 【0416】

抗体フラグメントは、非特異的チオールプロテアーゼであるパパインによる免疫グロブリン全体のタンパク質分解によって得られ得る。パパイン消化により、2つの同一の抗原結合フラグメント（「Fabフラグメント」および残りの「Fcフラグメント」と呼ばれ、Fabフラグメントは、各々が単一の抗原結合部位を有する）が得られる。

## 【0417】

パパインはまず、活性部位中のスルフヒドリル基を、システイン、2-メルカプトエタノールまたはジチオスレイトールで還元することによって活性化されなければならない。ストック酵素中の重金属は、最大の酵素活性を補償するために、EDTA（2 mM）でのキレート化によって除去されるべきである。酵素および基質は、通常、1：100の重量比で一緒に混合される。インキュベーションの後に、この反応は、ヨードアセトアミドを用いるチオール基の不可逆的なアルキル化によってか、または単純に透析によって停止され得る。この消化の終了は、SDS-PAGEによってモニターされ、そして種々の画分は、プロテインA-Sepharoseまたはイオン交換クロマトグラフィーによって分離されるべきである。

## 【0418】

ウサギおよびヒト起源のIgGからのF(ab')<sub>2</sub>フラグメントの調製のための通常の手順は、酵素のペプシンによる限定されたタンパク質分解である。この条件（100×抗体過剰w/w酢酸緩衝液中pH4.5、37℃）は、抗体が重鎖内のジスルフィド結合のC末端側にて切断されることを示唆する。マウスIgGの消化の速度は、サブクラスで変動し得、そして条件は、有意な量の完全に

分解されたIgGを避けるように選択されるべきである。特に、IgG<sub>2b</sub>は、完全な分解を受けやすい。他のサブクラスは、最適な結果を生じるために異なるインキュベーション条件（これらの全ては、当該分野で公知である）を必要とする。

#### 【0419】

インタクトな抗体のペプシン処理により、2つの抗原結合部位を有するF(a b')<sub>2</sub>フラグメントが得られ、そしてなお抗原を架橋し得る。ペプシンによるラットIgGの消化は、0.1M 酢酸緩衝液、pH4.5、中での透析、次いで1% w/wペプシンを用いる4時間のインキュベーションを含む条件を必要とする；IgG<sub>1</sub>およびIgG<sub>2a</sub>消化は、初めに4℃で16時間の0.1Mホルメート緩衝液、pH2.8、続いて酢酸緩衝液に対して透析される場合に、改善される。IgG<sub>2b</sub>は、0.1Mリン酸緩衝液、pH7.8中のstaphylococcus V8プロテアーゼ(3%w/w)における37℃で4時間のインキュベーションでより一貫した結果を生じる。

#### 【0420】

Fabフラグメントはまた、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)を含む。Fab'フラグメントは、抗体ヒンジ領域由来の1以上のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシル末端でのいくつかの残基の付加によって、Fabフラグメントと異なる。F(a b')<sub>2</sub>抗体フラグメントは、それらの間にヒンジシステインを有するFab'フラグメントの対として、本来生成された。抗体フラグメントの他の化学的カップリングは公知である。

#### 【0421】

「Fv」フラグメントは、完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含む最小の抗体フラグメントである。この領域は、密接した共有結合(covalent association)した1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインとのダイマーから構成される。各可変ドメインの3つの超可変領域が、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>ダイマーの表面上の抗原結合部位を規定するように相互作用することは、この構成内にある。集合的に、6つの超可変領域は、抗体に抗原結合特異性を与える。しかし、単一の可変ドメイン（または抗原に対して特異的な3つの



超可変領域のみを含むF<sub>v</sub>の半分)でさえ、全結合部位よりも低い親和力であるが、抗原を認識しかつ結合する能力を有する。

#### 【0422】

「単鎖F<sub>v</sub>」または「sF<sub>v</sub>」抗体フラグメントは、抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインを含み、ここでこれらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。一般的に、F<sub>v</sub>ポリペプチドは、V<sub>H</sub>ドメインとV<sub>L</sub>ドメインとの間のポリペプチドリンカーをさらに含み、これはsF<sub>v</sub>が抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にする。

#### 【0423】

以下の特許および特許出願は、抗体の機能的な抗原結合領域（抗VEGF抗体のscF<sub>v</sub>、F<sub>v</sub>、Fab'、FabおよびF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを含む）の調製および使用に関する本教示をなおさらに補足する目的のために、本明細書中に参考として具体的に援用される：米国特許第5,855,866号；同第5,965,132号；同第6,051,230号；同第6,004,555号；および同第5,877,289号；ならびに米国特許出願第08/482,369号（1998年10月20日に特許証発行料金が支払われた）。WO98/45331もまた、抗体の可変領域、超可変領域、および相補性決定領域（CDR）（\_\_\_\_\_を含む）の調製をなおさらに記載および教示することを含む目的のために、本明細書中に参考として援用される。

#### 【0424】

「diabody」は、2つの抗原結合部位を有する小さい抗体フラグメントであり、このフラグメントは、同じポリペプチド鎖（V<sub>H</sub>—V<sub>L</sub>）において軽鎖可変ドメイン（V<sub>L</sub>）に接続された重鎖可変ドメイン（V<sub>H</sub>）を含む。同じ鎖上で2つのドメインの間の対形成を可能にするには短すぎるリンカーを用いることによって、これらのドメインは、別の鎖の相補ドメインと対を形成することを強いられ、そして2つの抗原結合部位を作製する。diabodyは、EP404,097およびWO93/11161（各々、本明細書中に参考として具体的に援用される）に記載される。「線形抗体（linear antibody）」（これは、二特異的または一特異的であり得る）は、Zapataら（1995）（

本明細書中に参考として具体的に援用される)に記載されるように、一対の抗原結合領域を形成する一対のタンデム型F<sub>d</sub>セグメント(V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1)を含む。

#### 【0425】

抗体のF<sub>a</sub>b'フラグメントまたは抗原結合フラグメントの使用において、組織貫通に対する付帯利益と共に、その半減期を増加するようにフラグメントを改変することにより、さらなる利点を引き出し得る。種々の技術(例えば、抗体分子自身の操作または改変、およびまた不活性なキャリアへの結合)が使用され得る。薬剤を標的に送達するのではなく、半減期を増加させるただ一つの目的のために、任意の結合が注意深くアプローチされるべきであり、その際にF<sub>a</sub>b'および他のフラグメントは、組織を貫通するように選択される。それでもなお、非タンパク質ポリマー(例えば、PEGなど)への結合が意図される。

#### 【0426】

従って、結合ではなく改変は、抗体フラグメントをより安定にし、そして/または身体における異化作用の速度を減少させるように、抗体フラグメントの構造を改変することに基づく。このような改変の1つのメカニズムは、L-アミノ酸の代わりにD-アミノ酸の使用である。このような改変の導入は、得られた分子がなお所望の生物学的特性を保持していることを確実にするために、得られた分子の厳密な試験を次に必要とすることを当業者は理解する。さらなる安定化改変は、N末端もしくはC末端のいずれか、またはその両方への、安定化部分の付加の使用を含み、これは、一般的には生物学的分子の半減期を延ばすために使用される。例示のみの目的で、アシル化またはアミノ化によって末端を改変することを所望し得る。

#### 【0427】

本発明と共に使用するための適度な結合型改変は、サルベージレセプター結合エピトープを抗体フラグメントに組み込む工程を包含する。これを達成するための技術としては、抗体フラグメントの適切な領域の変異、または抗体フラグメントに付着するペプチドタグとしてのエピトープの組み込みが挙げられる。WO96/32478は、このような技術をさらに説明する目的のために、本明細書中

に参考として具体的に援用される。サルベージレセプター結合エピトープは、代表的には、抗体フラグメントの類似の位置に移されるFcドメインの1つまたは2つのラップ(loop)由来の3つ以上のアミノ酸の領域である。WO98/45331のサルベージレセプター結合エピトープは、本発明と共に使用するために、本明細書中に参考として援用される。

#### 【0428】

##### (B12. 結合アッセイおよび機能アッセイ)

本発明は、動物およびヒト処置レジメンにおいて有意な用途を有するが、多くの他の実用的用途(多くのインビトロ用途を含む)もまた有する。特定のこれらの用途は、抗体または免疫複合体の特異的結合特性に関する。本発明のそれらのすべての化合物には、少なくとも1つの抗体要素が含まれ、これらは最初の抗体が使用され得る実質的にすべての結合実施形態において使用され得る。

#### 【0429】

付着薬剤の存在は、関連する場合、有利な特性を提供するが、任意の結合アッセイにおける第1の抗体領域の利用を否定しない。従って、適切に有用な結合アッセイとしては、本明細書中にさらに記載されるような、当該分野において通常使用される結合アッセイ(例えば、イムノブロット、ウエスタンブロット、ドットブロット、RIA、ELISA、免疫組織学、蛍光標示式細胞分取(FACS)、免疫沈降、アフィニティークロマトグラフィーなど)が挙げられる。

#### 【0430】

特定の標準的な結合アッセイは、抗原が固体支持体マトリックス(例えば、ニトロセルロース、ナイロンまたはそれらの組み合わせ)に固定されている(例えば、イムノブロット、ウエスタンブロットおよび関連するアッセイにおけるような)アッセイである。他の重要なアッセイは、ELISAである。すべてのこのようなアッセイは、血管形成疾患の診断において適用され得るように、VEGFの検出における使用のために容易に適用され得る。本発明の薬剤はまた、免疫組織化学において；蛍光標示式細胞分取、フローサイトメトリーまたはフロー蛍光測定において；免疫沈降において；抗原精製実施形態(例えば、アフィニティークロマトグラフィー(二特異的抗体の場合をも含む)、1以上の抗原の同時の

1 工程急速精製) ; ならびに本明細書中で示される情報を与えられた当業者に公知の多くの他の結合アッセイにおいて、新しく冷凍したパラフィン包埋組織ブロックおよびホルマリン固定したパラフィン包埋組織ブロックの両方と共に使用され得る。

#### 【0431】

本抗体のさらなる実用的用途は、機能的アッセイにおけるコントロールとしてである。これらは、多くのインビトロおよびエキソビボアッセイおよび系ならびに動物モデル研究を含む。本発明の抗体の結合特性および機能的特性が特に特異的である場合（すなわち、これらがVEGFの（VEGFR1ではなく）VEGFR2への結合およびVEGFR2を介したシグナル伝達を阻害する）、このような「コントロール」用途は、実際に非常に有用である。本発明のこのような実用的適用から利益を得るアッセイとしては、例えば、VEGF媒介内皮細胞増殖、VEGF誘導リン酸化およびVEGF誘導血管浸透性に関連するアッセイ、ならびに新生血管形成の角膜マイクロポケットアッセイおよびニワトリ絨毛尿膜（CAM）アッセイが挙げられる。これらのアッセイ系はまた、インビトロまたはエキソビボ薬物スクリーニングアッセイに発展し、ここで十分に規定された特性を有する生物学的材料の本提供は、特に重要である。

#### 【0432】

##### （C. 免疫結合体）

本発明は、抗血管形成方法における使用のための非常に効果的な裸の抗体または非結合抗体を提供するが、VEGFR2遮断抗体（抗VEGF抗体）または2C3に基づく免疫結合体、イムノトキシンおよびコアグリガンド（coagulant）もまた本明細書によって提供される。VEGFR2遮断抗体（抗VEGF抗体）または2C3に基づく治療的結合体における使用のための現在好ましい薬剤は、放射線療法剤（本明細書中に開示される放射線診断によって例示されるような）、抗血管形成剤、アポトーシス誘導剤、抗チューブリン剤、抗細胞剤または抗細胞傷害剤および凝血剤（凝固因子）である。

#### 【0433】

免疫結合体、イムノトキシンおよびコアグリガンドを生成するために、当業者

に公知であり、かつ本明細書中でさらに開示されるように、組換え発現を使用して融合タンパク質を作製し得る。同様に、免疫結合体、イムノトキシンおよびコアグリガンドは、アビジン：ビオチン架橋または任意の化学的結合および抗体結合体に関して開発された架橋技術を用いて生成され得る。

#### 【0434】

##### (C1. 毒素および抗細胞性薬剤)

特定の適用のために、治療剤は、内皮細胞の増殖または細胞分裂を消失または抑制する能力を有する、細胞傷害性薬剤または薬理的薬剤、特に細胞傷害性薬剤、細胞分裂抑制剤か、そうでなければ抗細胞性薬剤である。一般に、本発明のこれらの局面は、VEGFR2を遮断、抗VEGF抗体または2C3様抗体に結合されて、そして活性な形態で標的化される内皮に送達され得る任意の薬理的薬剤の使用を意図する。

#### 【0435】

例示的な抗細胞性薬剤には、化学療法剤および細胞毒が挙げられる。使用され得る化学療法剤には以下が挙げられる：ホルモン（例えば、ステロイド）；代謝拮抗薬（例えば、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、メトトレキサートまたはアミノプテリン）；アントラサイクリン；マイトマイシンC；ビンカアルカロイド類；デメコルチン；エトポシド；ミトラマイシン；抗腫瘍アルキル化剤（例えば、クロラムブシルまたはメルファラン）。他の実施形態は、サイトカインのような薬剤を含み得る。基本的には、標的化された内皮細胞の部位での血液成分への標的化、インターナリゼーション、放出および／または提示を可能にする様式で、抗体に首尾良く結合され得るか、またはそれと会合され得る限り、任意の抗細胞性薬剤が使用され得る。

#### 【0436】

例えば、標的抗原が、毒性化合物による効率的な中毒と一致する経路によってインターナライズしない場合、化学療法剤（例えば、抗腫瘍薬物、サイトカイン、代謝拮抗薬、アルキル化剤、ホルモンなど）を標的化することが望まれる場合のような状況が存在し得る。種々の化学療法剤および他の薬理的薬剤（ドキソルビシン、ダウノマイシン、メトトレキサート、ビンブラスチン、ネオカルチノ

スタチン、マクロマイシン、トレニモン (t r e n i m o n) および  $\alpha$ -アマニチンを含む) は、現在では、抗体に首尾良く結合され、そして薬理学的に機能することが示されている。

#### 【0437】

他の状況において、細胞毒に基づく治療由来の任意の潜在的な副作用が、DNA合成インヒビター (例えば、ダウノルビシン、ドキソルビシン、アドリアマイシンなど) の使用によって除去され得る。従って、これらの薬剤は、本発明における使用のための抗細胞性薬剤の好ましい例である。

#### 【0438】

細胞分裂抑制剤に関して、そのような化合物は、一般に、標的細胞の天然の細胞周期を、好ましくはその細胞が細胞周期からはずされるように妨害する。例示的な細胞分裂抑制剤は含む。

#### 【0439】

VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体に結合され得る、広範な種々のネガティブが公知である。例には、いくつか例を挙げると、例として以下が挙げられる多くの有用な植物由来毒素、真菌由来毒素または細菌由来毒素が挙げられる：種々のA鎖毒素、特にリシンA鎖；リボソーム不活化タンパク質 (例えば、サポリンまたはゲロニン) ； $\alpha$ -サルシン；アスペルギリン；レストリクトシン (r e s t r i c t o c i n) ；リボヌクレアーゼ (例えば、胎盤リボヌクレアーゼ) ；ジフテリア毒素；および p s e u d o m o n a s 外毒素。

#### 【0440】

毒素のうち、リシンA鎖が好ましい。本発明に関する使用のための最も好ましい毒素部分は、炭水化物残基を改変または除去するように処理された毒素A鎖、いわゆる脱グリコシル化A鎖 (d g A) である。脱グリコシル化リシンA鎖は、その極度の有効性、より長い寿命のため、そして臨床等級および規模での製造に経済的に適切であるために好ましい。

#### 【0441】

最も小さな分子であるが、にもかかわらず適切な生物学的応答を提供することが可能な分子を使用することは、薬理学的見地から望ましくあり得る。例えば、

十分な抗細胞応答を提供するより小さなA鎖ペプチドを使用することが望まれ得る。この目的のために、リシンA鎖は、Nagarse (Sigma) による30のN末端アミノ酸の除去によって「切り詰め」され得、そしてなお十分な毒素活性を保持し得ることが発見されている。所望される場合、この切り詰めされたA鎖は、本発明に従って結合体において使用され得ることが提案される。

#### 【0442】

あるいは、毒素A鎖部分への組換えDNA技術の適用は、本発明によるさらなる利益を提供することが理解され得る。生物学的に活性なリシンA鎖のクローニングおよび発現が達成されているという点で、現在では、より小さいまたは他の様式の改変体ペプチドであるが、にもかかわらず適切な毒素活性を示す改変体ペプチドを同定および調製することが可能である。さらに、現在では、リシンA鎖がクローニングされているという事実によって、部位特異的変異誘発の適用が可能であり、それを通じて、A鎖由来ペプチドが容易に調製およびスクリーニングされ得、そして本発明と組み合わせての使用のためのさらなる有用な部分が得られる。

#### 【0443】

##### (C2. 凝固因子)

本発明のVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体は、凝固を直接的または間接的に刺激し得る成分に連結され、コアグリガンドを形成し得る。ここで、この抗体は、凝血薬または凝固因子に直接的に連結され得るか、または凝血薬もしくは凝固因子を結合し、次いでそれらを放出する第2の結合領域に連結され得る。本明細書中で使用される用語「凝血薬」および「凝固因子」を各々使用して、適切な条件下、好ましくは特定のインビボ環境（例えば、腫瘍血管構造）に提供される場合に、凝固を直接的または間接的に刺激し得る成分をいう。

#### 【0444】

好ましい凝固因子は、組織因子組成物（例えば、切り詰めされたTF (tTF)、ダイマーTF分子、マルチマーTF分子および変異体TF分子）である。「切り詰めされたTF (truncated TF)」(tTF)は、膜結合欠損

に、この特性における変化をもたらすために十分なアミノ酸配列を除去することによってされているTF構造をいう。この状況において「十分な量」とは、TF分子を膜中に進入させるか、またはTFタンパク質の機能的な膜結合を他の様式で媒介するに元々十分な、膜貫通アミノ酸配列の量である。従って、このような「十分な量の膜貫通配列」の除去は、リン脂質膜結合能を欠損した切り詰めされた組織因子タンパク質またはポリペプチドを生じ、その結果、このタンパク質は、実質的に、リン脂質膜に有意に結合しない可溶性タンパク質である。従って、切り詰めされたTFは、実質的に、標準的なTFアッセイにおいて第VII因子を第VIIa因子に変換し得ず、そしてなお第VIIa因子の存在下で第X因子を活性化することを含む、いわゆる触媒活性を保持する。

#### 【0445】

米国特許第5,504,067号は、そのような切り詰めされた組織因子タンパク質をさらに記載する目的のために、特に本明細書中において参考として援用される。好ましくは、本発明のこれらの局面における使用のための組織因子は、一般に、タンパク質の膜貫通領域および細胞質領域（アミノ酸220～263）を欠く。しかし、切り詰めされたTF分子が、219アミノ酸という正確な長さの分子に限定される必要はない。

#### 【0446】

組織因子組成物はまた、ダイマーとして有用であり得る。任意の切り詰めされた組織因子構築物、変異された組織因子構築物、または他の組織因子構築物は、本発明における使用のためにダイマー形態で調製され得る。当業者に公知のように、このようなTFダイマーは、分子生物学および組換え発現の標準的な技術を使用することによって調製され得る。ここで2つのコード領域は、インフレームに調製され、そして発現ベクターから発現される。同様に、種々の化学結合技術が、TFダイマーの調製と組み合わせて使用され得る。個々のTFモノマーは、結合の前に誘導体化され得る。すべてのこのような技術は、当業者に容易に公知である。

#### 【0447】

所望される場合、組織因子ダイマーまたはマルチマーは、生物学的に放出可能



な (biologically-releasable) 結合 (例えば、選択的に切断可能なリンカーまたはアミノ酸配列) を介して結合され得る。例えば、腫瘍環境内で優先的に配置されるか、または活性である酵素についての切断部位を含むペプチドリンカーが意図される。そのようなペプチドリンカーの例示的な形態は、ウロキナーゼ、プラスミン、トロンビン、第IXa因子、第Xa因子またはメタロプロテイナーゼ (例えば、コラーゲナーゼ、ゲラチナーゼまたはストロメライシン) によって切断されるペプチドリンカーである。

#### 【0448】

特定の実施形態において、組織因子ダイマーはさらに、後にリン脂質膜と組織因子の機能的会合を (特定の所定の条件下のみであるが) 強化するために、妨げられた疎水性膜挿入部分を含み得る。切り詰めされた組織因子の状況において記載される場合、疎水性膜会合配列は、一般に、それらの疎水性の性質に起因して、リン脂質環境との会合を促進するアミノ酸のストレッチである。同様に、脂肪酸は、潜在的な膜挿入部分を提供するために使用され得る。

#### 【0449】

このような膜挿入配列は、それらの付着がTF構築物の機能的特性を妨げない限り、TF分子のN末端もしくはC末端のいずれかに位置され得るか、または一般に膜の任意の他の点に付加され得る。妨げられた挿入部分の意義は、TF構築物が腫瘍環境に位置するまで、それは非機能性を保持し、そして疎水性付加が、接近可能になり、そしてなおさらに膜との物理的会合を促進するのを可能にすることである。再度、生物学的に放出可能な結合および選択的に切断可能な配列が、この点において特に有用であり、結合または配列のみが、腫瘍環境内の局在化および特定の酵素または他の生物活性分子への曝露の際に切断または他の様式で改変されることが意図される。

#### 【0450】

他の実施形態において、TF構築物は、マルチマーまたはポリマーであり得る。この状況において、「ポリマー構築物」は、3以上の組織因子構築物を含む。「マルチマーTF構築物またはポリマーTF構築物」は、少なくとも第2および第3のTF分子または誘導体に作動可能に結合された第1のTF分子または誘

導体を含む構築物である。マルチマーは、約3～約20のこのようなTF分子を含み得る。マルチマーまたはポリマー内の個々のTF単位はまた、所望される場合、選択的に切断可能なペプチドリンカーまたは他の生物学的に放出可能な結合によって連結され得る。再度、上記に議論されたTFダイマーに関して、構築物は、組換え操作および発現を用いるか、または標準的な合成化学を用いるかのいずれかで容易に作製され得る。

#### 【0451】

本発明の状況において有用なおさらなるTF構築物は、第VII因子を活性化する能力が欠損している変異体である。そのような「第VII因子活性化変異体」は、一般に、機能的な第VII/VIIa因子を結合し、第X因子をタンパク質分解性に活性化するが、第VII因子をタンパク質分解性に活性化する能力が実質的に存在しないTF変異体として本明細書中において定義されている。従って、そのような構築物は、第VII因子活性化活性を欠くTF変異体である。

#### 【0452】

そのような第VII因子活性化変異体が、腫瘍特異的凝固を促進する際に機能する能力は、腫瘍血管構造へのそれらの特異的送達、および血漿中における低いレベルでの第VIIa因子の存在に基づく。そのような第VII因子活性化変異体標的化剤結合体の投与の際に、変異体は、血管新生化腫瘍の血管構造内に局在化される。局在化の前に、TF変異体は、一般に、第VII因子を第VIIa因子に変換し得ないことに基づいて、任意の他の身体部位における凝固を促進し得ない。しかし、次いで、腫瘍領域内の局在化および蓄積の際に、変異体は、外因性の凝固経路を開始するために血漿から十分な第VIIa因子と出会い、腫瘍特異的血栓症を導く。外因性の第VIIa因子もまた患者に投与され得る。

#### 【0453】

種々の第VII因子活性化変異体のうちの任意の1つ以上が調製され、本発明と組み合わせて使用され得る。第VII/VIIa因子についてのTF分子上の認識部位に関して、有意な量の科学知識が存在する。従って、第VII活性化領域が、一般にTF分子のおよそアミノ酸157～およそアミノ酸167の間に位置することが理解される。しかし、この領域の外側の残基もまた、第VII活性

【0 4 5 4】

【0 4 5 5】

【0 4 5 6】

【0 4 5 7】

【0 4 5 8】

$\alpha$  2-抗プラスミン、すなわち、 $\alpha$  2-プラスミンインヒビターは、プラスミノゲンアクチベーターによって誘導されるフィブリン血餅の溶解を効率的に阻害するように機能する、ヒト血漿において天然に存在するプロテイナーゼインヒビターである。 $\alpha$  2-抗プラスミンは、特に強力なインヒビターであり、そして本発明の用途のために意図される。

#### 【0459】

$\alpha$  2-抗プラスミンについてのcDNA配列が利用可能である場合、組換え発現および／または融合タンパク質が好ましい。 $\alpha$  2-抗プラスミンに対するモノクローナル抗体もまた利用可能であり、これは本発明の二重特異性結合リガンドの実施形態において使用され得る。これらの抗体は、標的部位に外因性 $\alpha$  2-抗プラスミンを送達するために使用されるか、または内因性 $\alpha$  2-抗プラスミンを収集し、そして標的領域内でそれを濃縮するために使用され得る。

#### 【0460】

##### (C3. 抗チューブリン薬)

一連の薬物は、チューブリン活性との干渉を介してその効果を行使する。チューブリンの機能は、有糸分裂および細胞の生存能力に不可欠であるので、特定の「抗チューブリン薬」は、強力な化学療法剤である。いくつかの周知であってかつ本発明とともに使用するための現在好ましい抗チューブリン薬は、コルヒチン；タキサン（例えば、タキソール）；ビンカアルカロイド類（例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチンおよびビンデスチン）；およびコンブレタスタチン（*combrestatatin*）である。他の適切な抗チューブリン薬は、サイトカラシン類（B、J、Eを含む）、ドラスタチン（*dolastatin*）、オーリスタチン（*auristatin*）PE、パクリタキセル、ウスチロキシ（*ustiloxin*）D、リゾキシ（*rhizoxin*）、1069C85、コルセミド（*colcemid*）、アルベンダゾール、アザトキシ（*azatoxin*）およびノコダゾールである。

#### 【0461】

米国特許第5, 892, 069号、同第5, 504, 074号、および同第5, 661, 143号（各々本明細書中に詳細に参考として援用される）に記載さ

れるように、コンブレタスタチン類は、一般に細胞有糸分裂を阻害するエストロジオール誘導体である。本発明と組合せて使用され得る例示的なコンブレタスタチンとしては、コンブレタスタチンA、Bおよび／またはDを基本とするコンブレタスタチンならびに米国特許第5,892,069号、同第5,504,074号、および同第5,661,143号に記載されるコンブレタスタチンが挙げられる。コンブレタスタチンA-1、A-2、A-3、A-4、A-5、A-6、B-1、B-2、B-3およびB-4は、上記の型の例である。

#### 【0462】

米国特許第5,569,786号および同第5,409,953号は、コンブレタスタチンA-1、A-2、A-3、B-1、B-2、B-3およびB-4の各々の単離、構造的特徴付けおよび合成、ならびにこのようなコンブレタスタチンを使用して新生物性増殖を処置するための処方物および方法を記載する目的のために、本明細書中に参考として援用される。任意の1つ以上のこのようなコンブレタスタチンは、本発明と組合せて使用され得る。

#### 【0463】

米国特許第5,892,069号、同第5,504,074号、同第5,661,143号および同第4,996,237号（各々詳細に本明細書中で参考として援用される）に記載されるように、コンブレタスタチンA-4はまた、本発明と共に使用され得る。米国特許第5,561,112号は、適切なコンブレタスタチンA-4プロドラッグ（これらは、本発明とともに組合せて使用することが意図される）を適切に記載するために、本明細書中に参考として援用される。

#### 【0464】

米国特許第4,940,726号（本明細書中に参考として詳細に援用される）は、コンブレタスタチンD-1および「コンブレタスタチンD-2」と称される大環状ラク톤を詳細に記載し、これらは、本発明の組成物および方法と組み合わせて使用され得る。米国特許第5,430,062号（本明細書中に参考として詳細に援用される）は、抗癌活性を有するスチルベン誘導体およびコンブレタスタチンアナログに関し、これらは本発明と組合せて使用され得る。

#### 【0465】

## (C 4. 抗脈管形成剤)

本発明は、組合せた抗脈管形成を特に提供する。アンギオポエチンは、VEGFファミリーのメンバーと同様に、血管内皮に特異的な増殖因子である(DavisおよびYancopoulos、1999; Holashら、1999; 本明細書中で参考として援用される)。最初に記載されたアンギオポエチンは、天然に存在するレセプター賦活体またはアゴニストであるアンギオポエチン-1 (Ang-1; 配列番号1および配列番号2)、および天然に存在するレセプターアンタゴニストであるアンギオポエチン-2 (Ang-2; 配列番号3および配列番号4)であった。この両方は、内皮細胞チロシンキナーゼレセプターTie2によって作用する。

## 【0466】

2つの新しいアンギオポエチンである、アンギオポエチン-3 (マウス) およびアンギオポエチン-4 (ヒト) もまた同定された(Valenzuelaら、1999)。アンギオポエチン-3は、(Ang-2のような)アンタゴニストとして作用するようであるが、アンギオポエチン-4は、(Ang-1のような)アゴニストとして機能するようである(Valenzuelaら、1999)。アンギオポエチン-3と呼ばれるタンパク質はまた、ヒト心臓からクローニングされ、そして内皮細胞に対してマイトジェン効果を有しないと報告された(Kimら、1999)。

## 【0467】

VEGFは、血管発達の早期の段階のために必要であるが、アンギオポエチン-1は、一般に、血管新生のより後期の段階に必要とされる。従って、VEGFは、内皮細胞分化、増殖および初期の血管形成を促進するように作用する。アンギオポエチン-1は、Tie2レセプターを介して、成熟管の維持および安定化を促進するように作用する。従って、アンギオポエチン-1は、成熟因子または安定化因子であり、これは、内皮細胞と周囲の支持細胞との間の相互作用を促進することにより未成熟の血管を成熟した血管に変換する(Holashら、1999)。

## 【0468】

アンギオポエチン-1は、虚血性組織において血管再生を増強すること（Shyuら、1998）、およびVEGFまたはaFGFの形態のいずれかに曝露された血管網の生存を増加すること（Papapetropoulosら、1999）が示されている。これらの著者らはまた、アンギオポエチン-1が、同じ形態のaFGFの撤退によって誘発されるHUVECにおけるアポトーシス死を妨げることを示した（Papapetropoulosら、1999）。そのようなデータは、ヒト内皮細胞に対するアンギオポエチン-1の直接的な役割、および分化した内皮細胞の生存を促進することによって血管構造を安定化する他の血管形成分子との相互作用と一致する。

#### 【0469】

アンギオポエチン-1は、成熟シグナルおよび安定性シグナルを伝達するので、本発明者らは、標的アンギオポエチン-1の送達に関する本発明の局面について注意深く考えた。本発明者らは、アンギオポエチン-1は、成熟因子であるので、腫瘍血管を増殖因子非依存性にすると推論した。従って、発明の1つの局面は、標的管のVEGF非応答性特性を固めるための非標的化アンギオポエチン-1の使用に関する。

#### 【0470】

腫瘍結合リガンドを使用して、アンギオポエチン-1分子を腫瘍血管に送達することは、500,000のオーダーのアンギオポエチン分子を管腔に容易に送達すると推論される。これは、Tie2レセプター系を圧倒し、全体としてTie2レセプターをアンギオポエチン-1リガンドで飽和させる。従って、アンギオポエチン-2は、結合し得ないので、アンギオポエチン-2およびVEGFの組合せた効果（以下の考察を参照のこと）は、阻害される。

#### 【0471】

アンギオポエチン-1の腫瘍への送達、好ましくは腫瘍脈管構造への送達をまた種々の他の抗癌ストラテジーと共に使用して、本明細書中に詳細に記載されるように、組合された治療的効果を達成する。少なくともいくつかの壊死を誘発する治療に対する腫瘍の代表的な応答は、脈管再生を開始することである。アンギオポエチン-1のシグナルは、血管を成熟に向かわせるので、これらを除く

ことはできず、そして初期の治療剤により誘発される腫瘍塊の損失を補うことができない。したがってこれらの観測は、アンギオポエチン送達の発明（すなわち、従来の化学療法薬を含む任意の1つ以上の抗癌剤との組み合わせたアンギオポエチン-1 標的化の組合された使用）の別の好ましい局面を提供する。

#### 【0472】

送達に対するアンギオポエチン-1 の作用は、基本的に脈管再形成機能（remodeling）を予防することである。これが単独で使用されても、治療剤と組合せて使用されても、アンギオポエチン-1 標的化の価値は、この治療的アプローチにおける固有の安全性により特に増強される。アンギオポエチン-1 治療に対する有意な欠点は存在しない。ある量の標的化Ang-1 が非腫瘍組織に誤まって与えられるという起こりそうもない事象においてさえ、その結果起こる全てのことは、標的領域における脈管構造が、より安定になり、かつ／または休止状態になることである。これに関して、Ang-1 はまた、抗炎症剤として使用され得る。

#### 【0473】

アンギオポエチン-2 は、腫瘍標的治療における使用、特に本発明のVEGF 阻害と組合せた使用のために、現在では好ましい薬剤である。しかし、異なる条件下、特に変化するVEGF レベルで、アンギオポエチン2 の特異な効果に起因して、本発明者らは、標的化アンギオポエチン-2 送達に関する本発明の局面を注意深く再考した。

#### 【0474】

アンギオポエチン-2 はまた、Tie2 レセプターのリガンドであるが、一般的にはアンギオポエチン-1 により媒介される血管成熟／安定化を中和する。従ってこれはアンギオポエチン-1 のアンタゴニストであり、毛細構造を乱すように作用する。適切な条件下では、アンギオポエチン-2 は、ネガティブシグナルを標的細胞に伝達し、そしてアンギオポエチン-2 により誘発された不安定化は、脈管の後退をもたらす。このことは、腫瘍、好ましくは腫瘍脈管構造へのアンギオポエチン-2 の標的化送達において開拓されるアンギオポエチン-2 の第1 の特徴である。単に送達する十分なアンギオポエチン-2 （これは、2C3 の



ようなVEGFR2遮断抗VEGF抗体を使用して容易に達成可能である)は、腫瘍環境において存在し得る任意の他のシグナルを圧倒し、そして脈管後退を促進する。天然の環境においてアンギオポエチン間に注意深く制御された相互作用が存在するので、後退に有利な系の異常な偏りは、絶え間ないアンギオポエチン-2シグナル伝達により、アンギオポエチン-1およびVEGFの両方の効果を消去し得る。

#### 【0475】

従って、腫瘍標的化アンギオポエチン-2の単独使用は、特に治療的介入の初期の機構として、腫瘍血管後退を誘発するために有利になるように用いられ得る。けれども一般的には、アンギオポエチン-2により誘発される不安定化が、脈管後退または再生のいずれかをもたらし得る。他の脈管形成刺激の非存在下、特にVEGFの非存在下では、脈管後退に至るのは不安定化であるが；一方、高レベルのVEGFの存在下での不安定化は、脈管形成応答を促進する(Holashら、1999)。

#### 【0476】

アンギオポエチン-2に応答して不安定化を受ける脈管は、他の刺激に曝露することにより後退から「救出」され得る。従って、アンギオポエチン-2は、内皮細胞を他の脈管形成刺激に応答性にし、そして規定された条件下で脈管形成応答を促進する。特に、VEGFは、ang-2不安定化細胞を増殖させ得、そして初期の新脈管を形成させ得る(Asaharaら、1998；Holashら、1999)。実際、腫瘍組織におけるアンギオポエチン-2発現は、報告されており(Tanakaら、1999)、ここでVEGFと組み合わせさせて作用して、脈管形成を促進するということが推定された(Stratmannら、1998)。アンギオポエチン-2およびVEGFにより開始される新脈管形成は、これらの分子を「共脈管形成性(co-angiogenic)」にする。

#### 【0477】

特定の腫瘍型における血管に対するアンギオポエチン-2のポジティブおよびネガティブの効果を説明するための統合されたモデルは、これまでに報告されている(Holashら、1999)。このモデルにおいて、アンギオポエチン-

2誘発不安定化は、周囲の宿主脈管構造から血管を選出する（c o o p t i n g）ことにより生じる、腫瘍における有意な脈管後退を最初に引き起こす。腫瘍に付随する内皮細胞により産生される高レベルのアンギオポエチン-2は、アンギオポエチン-1の低レベルで構成性の発現により明確に発生される生存シグナルを無効にする。従って、アンギオポエチン-2は、アポトーシス後退について選出された脈管をマークする（H o l a s hら、1999）。しかし、生じた腫瘍壊死にもかかわらず、生存する腫瘍細胞は、その生存を確実にするためにV E G Fをアップレギュレートする。V E G Fは、アンギオポエチン-2からの後退シグナルを無効にし、そして実際脈管発生を促進するので（H o l a s hら、1999）、次いでV E G Fおよびアンギオポエチン-2の同時発現は、腫瘍末梢において頑健な脈管形成を生じる。

#### 【0478】

一見したところ矛盾しているように思われるが、アンギオポエチン-2の作用は、他の存在するシグナル、特にV E G Fに基づいて説明され得、そして多くは予測され得る。別の脈管形成シグナルの非存在下においてアンギオポエチン-2は、脈管を不安定化させ、そして未成熟にし、後退に至る。刺激、特にV E G Fの存在下において、脈管が二次的な脈管形成刺激を受容するように「準備される」と、アンギオポエチン-2により引き起こされる不安定化は、実際に脈管形成を生じる。従って、多数の調節因子の脈管形成効果は、少なくとも部分的に、微小血管内皮細胞におけるアンギオポエチン-2活性のオートクラインループの調節により達成され则认为られる（M a n d o r i o t aおよびP e p p e r, 1998）。

#### 【0479】

アンギオポエチン-2の二重の生物学的役割は、本発明者らに、腫瘍環境における他のシグナル、特にV E G Fを説明するさらなる治療的ストラテジーを開発させた。アンギオポエチン-2およびV E G Fは、協調して脈管形成を刺激するので、本発明の好ましい局面は本発明のV E G F阻害抗体と組み合わせて、腫瘍標的化アンギオポエチン-2送達を使用する。これにより、アンギオポエチン-2が後退において作用し、脈管形成において作用しないことを確実にする。

## 【0480】

上述の説明を考慮して、本発明は、VEGFR2遮断抗VEGF抗体（例えば、2C3）を提供し、この抗体は、アンギオポエチン-1、アンギオポエチン-2、アンギオポエチン-3および／またはアンギオポエチン-4のいずれか1つ以上に作動可能に連結されるか、そうでなければ機能的に関連するということが理解される。例示的なアンギオポエチン-1組成物は、配列番号1（DNA）および配列番号2（タンパク質）であり、一方アンギオポエチン-2組成物は、配列番号3（DNA）および配列番号4（タンパク質）により例示される。アンギオポエチン-3は、アンタゴニストであり、一般的にアンギオポエチン-2のように使用され；アゴニストアンギオポエチン-4は、アンギオポエチン-1の様式で使用され得る。Valenzuelaらの論文（1999）は、アンギオポエチン-3およびアンギオポエチン-4に関する本明細書の教示をさらに補充する目的のために、参考として詳細に援用される。

## 【0481】

さらに、アンギオポエチンの融合タンパク質はまた、本発明における使用が想像される。一例は、本明細書中に配列番号5として含まれる安定なAng-1-Ang-2融合タンパク質である。このタンパク質は、アミノ酸77で始まるアンギオポエチン-1配列に融合される、アンギオポエチン-2の最初の73残基、DAPLEY配列まで、を含む。これはまた、アンギオポエチン-1配列において位置265に変異を有し、ここでCysは、Serで置換される。

## 【0482】

本発明と共に使用するための他の抗脈管形成剤としては、アンギオスタチンおよびエンドスタチンが挙げられる。アンギオスタチンは、米国特許第5,776,704号；同第5,639,725号および同第5,733,876号において開示されている。これらの各々は、本明細書中に参考として援用される。アンギオスタチンは、還元ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって決定されるように、約38kDa～約45kDaの分子量を有するタンパク質であり、これは、プラスミノゲン分子のほぼクリングル領域1～4を含む。アンギオスタチンは、一般に、インタクトなマウスプラスミノゲン分子のアミノ酸番号98から開

始するマウスプラスミノーゲンのフラグメントと実質的に類似のアミノ酸配列を有する。

#### 【0483】

アンギオスタチンのアミノ酸配列は、種の間でわずかに変化する。例えば、ヒトアンギオスタチンにおいて、このアミノ酸配列は、上記のマウスプラスミノーゲンフラグメントの配列と実質的に類似であるが、活性なヒトアンギオスタチン配列は、インタクトなヒトプラスミノーゲンアミノ酸配列のアミノ酸番号97または99のいずれかで開始し得る。さらに、ヒトプラスミノーゲンは、類似の抗脈管形成活性を有するので、マウス腫瘍モデルにおいて示されるように使用され得る。

#### 【0484】

アンギオスタチンおよびエンドスタチンは、マウスにおいて、腫瘍増殖を阻害するだけでなく腫瘍後退もまたもたらす能力が実証された最初の新脈管形成インヒビターであるので、これらは熱心な研究の焦点となる。エラスターゼ、マクロファージメタロエラスターゼ (MME)、マトリリシン (matrilysin) (MMP-7)、および92 kDaゼラチナーゼB/IV型コラゲナーゼ (MMP-9) を含む、プラスミノーゲンからアンギオスタチンを生成することが示される複数のプロテアーゼが存在する。

#### 【0485】

MMEは、腫瘍においてプラスミノーゲンからアンギオスタチンを生成し得、そして顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) は、アンギオスタチンの生成を誘導するマクロファージによってMMEの発現をアップレギュレートする。アンギオスタチン生成におけるMMEの役割は、MMEが患者由来の肝細胞癌の臨床サンプルにおいて実際に発現されるという知見によって支持される。アンギオスタチンを生成し得ると考えられる別のプロテアーゼは、ストロメライシン-1 (MMP-3) である。MMP-3は、インビトロにおいてプラスミノーゲンからアンギオスタチン様フラグメントを生成することが示されている。アンギオスタチンについての作用機構は現在のところ明らかではなく、これが、プログラム化された細胞死または有糸分裂の阻止を受けるように内皮細胞を誘導

する内皮細胞上の同定されていない細胞表面レセプターに結合すると推定されている。

#### 【0486】

エンドスタチンは、さらにより強力な抗新脈管形成および抗腫瘍剤であるようであり、そしてVEGFR2遮断抗VEGF抗体（例えば、2C3）に連結するために特に好ましい。エンドスタチンは、マウスにおける多くの腫瘍モデルにおいて後退を生じることにおいて有効である。腫瘍は、エンドスタチンに対する耐性を発生させず、そして複数のサイクルの処置後に、腫瘍は、休眠状態に進入し、この間、これらは容量において増加しない。この休眠状態において、アポトーシスを受ける腫瘍細胞の割合は増加し、そして本質的に同じサイズをとどめる集団を生じた。

#### 【0487】

FolkmanおよびO'Reileyらへの米国特許第5,854,205号（本明細書中で参考として詳細に援用される）は、内皮細胞増殖および脈管形成のインヒビターとしてのエンドスタチンおよびその使用に関する。エンドスタチンタンパク質は、コラーゲンXVIIII型のC末端フラグメントに対応し、そしてこのタンパク質は、種々の供給源から単離され得る。米国特許第5,854,205号はまた、エンドスタチンが、コラーゲンXVIIII型、コラーゲンXV型、またはBOVMPE1プロガストリン（pregastric）エステラーゼのフラグメントのアミノ酸配列を有し得るということを教示する。エンドスタチンの他の抗脈管形成タンパク質、特にアンギオスタチンとの組み合わせはまた、米国特許第5,854,205号に記載され、その結果、組合された組成物は、脈管形成依存性腫瘍塊を効果的に後退させ得る。

#### 【0488】

エンドスタチンおよびアンギオスタチンは、本発明に従う腫瘍送達に好ましい薬剤である。バスキュロスタチン（vasculostatin）、カンスタチン（canstatin）およびマスピン（maspin）はまた、好ましい薬剤である。エンドスタチンは、特に最も好ましい薬剤の1つである。エンドスタチン2C3融合タンパク質は、本明細書中に記載されるように、調製され得る。

化学的に結合されたエンドスタチン-2 C 3 構築物の種々の形態はまた、本出願に記載される。

#### 【0489】

##### (C 5. アポトーシス誘発剤)

本発明はまた、腫瘍内の任意の細胞（腫瘍細胞および腫瘍脈管内皮細胞を含む）においてアポトーシスを誘発する。多くの抗癌剤は、その作用機構の一部として、アポトーシス誘発効果を有し得るが、特定の薬剤は、以下に記載されるように、主要な機構としてこのことを用いて、発見されるか、設計されるかまたは選択された。

#### 【0490】

多くの形態の癌において、腫瘍抑制遺伝子（例えば、p 5 3）における変異が報告されている。p 5 3の不活性化は、アポトーシスの促進の不全を生じる。この不全によって、癌細胞は、細胞死へと運命付けられるよりむしろ、腫瘍形成を進行させる。従って、腫瘍抑制因子の送達もまた、細胞死を刺激するために本発明での使用が意図される。例示的な腫瘍抑制因子としては、p 5 3、網膜芽細胞腫遺伝子（R b）、ウィルムス腫瘍（W T 1）、b a x  $\alpha$ 、インターロイキン-1 b-変換酵素およびファミリー、M E N-1 遺伝子、神経芽細胞腫 I 型（N F 1）、c d k インヒビター p 1 6、結腸直腸癌遺伝子（D C C）、家族性腺腫症ポリポーシス遺伝子（F A P）、多発性腫瘍抑制遺伝子（M T S-1）、B R C A 1 ならびに B R C A 2 が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0491】

使用のために好ましいのは、p 5 3（米国特許第 5, 7 4 7, 4 6 9 号；同第 5, 6 7 7, 1 7 8 号；および同第 5, 7 5 6, 4 5 5 号；各々は、参考として本明細書中に援用される）、網膜芽細胞腫、B R C A 1（米国特許第 5, 7 5 0, 4 0 0 号；同第 5, 6 5 4, 1 5 5 号；および同第 5, 7 1 0, 0 0 1 号；同第 5, 7 5 6, 2 9 4 号；同第 5, 7 0 9, 9 9 9 号；同第 5, 6 9 3, 4 7 3 号；同第 5, 7 5 3, 4 4 1 号；同第 5, 6 2 2, 8 2 9 号；および同第 5, 7 4 7, 2 8 2 号；各々は、参考として本明細書中に援用される）、M E N-1（G e n B a n k 登録番号 U 9 3 2 3 6 号）およびアデノウイルス E 1 A（米国特

許第5, 776, 743号; 参考として本明細書中に援用される) の遺伝子である。

#### 【0492】

VEGFR2遮断抗VEGF抗体(例えば、2C3)により送達され得る他の組成物としては、腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド(TRAILと称される)をコードする遺伝子、およびTRAILポリペプチド(米国特許第5, 763, 223号; 参考として本明細書中に援用される); 米国特許第5, 605, 826号(参考として本明細書中に援用される) 24kDアポトーシス関連プロテアーゼ; Fas関連因子1、FAF1(米国特許第5, 750, 653号; 参考として本明細書中に援用される)が挙げられる。インターロイキン-1 $\beta$ -変換酵素およびファミリーのメンバー(これらもまた、アポトーシスを刺激することが報告されている)の提供もまた、本発明のこれらの局面における使用のために意図される。

#### 【0493】

以下のような化合物もまた使用され得る; カルボスチリル(carbostyryl)誘導体(米国特許第5, 672, 603号; および同第5, 464, 833号; 各々は、参考として本明細書中に援用される); 分枝状アポトーシス原性(apogenic)ペプチド(米国特許第5, 591, 717号; 参考として本明細書中に援用される); ホスホチロシンインヒビターおよび非加水分解性ホスホチロシンアナログ(米国特許第5, 565, 491号; および同第5, 693, 627号; 各々は、参考として本明細書中に援用される); RXRレチノイドレセプターのアゴニスト(米国特許第5, 399, 586号; 参考として本明細書中に援用される); さらに、抗酸化剤(米国特許第5, 571, 523号; 参考として本明細書中に援用される)。チロシンキナーゼインヒビター(例えば、ゲニステイン)もまた、細胞表面レセプター(VEGFR1)を標的化する本発明の薬剤に連結され得る(参考として本明細書中に援用される米国特許第5, 587, 459号により支持されるように)。

#### 【0494】

(C6. 生物学的機能性等価物)

2 C 3 ベースの抗体または任意の他の V E G F R 2 遮断抗 V E G F 抗体の等価物またはさらなる改良物が、今や、一般には上記に提供される物質を出発点として使用して作製され得る。改変および変化が、このような抗体の構造中になされ得、そしてさらに類似または他の様式の所望の特徴を有する分子を入手し得る。例えば、特定のアミノ酸が、相互作用性結合能（例えば、アミノリン脂質、P S および P E への結合）のかなり大きな損失なしに、タンパク質構造において他のアミノ酸の代わりに置換され得る。これらの考察もまた、毒素、抗脈管形成剤、アポトーシス誘発剤および凝血薬などにあてはまる。

#### 【0495】

タンパク質の生物学的機能活性を規定するのは、タンパク質の相互作用能力および性質であるので、特定のアミノ酸配列置換がタンパク質配列（または、当然のことながら基礎の D N A 配列）中でなされ得、にもかかわらず類似（アゴニスト）の特性を有するタンパク質を入手し得る。従って、種々の変化が、それらの生物学的有用性または活性のかなり大きな損失なく、抗体または治療剤の配列（または、基礎の D N A 配列）になされ得ることが意図される。基礎の D N A 配列を変異することから作製される生物学的機能性等価物は、本明細書中の表 A において提供されるコドン情報、および部位特異的変異誘発に関する支持する技術的詳細を用いてなされ得る。

#### 【0496】

分子の所定の部分内になされ得、なお受容可能なレベルの等価な生物学的活性を有する分子を生じ得る変化の数に対して限界が存在するという概念が、「生物学的機能性等価物」タンパク質またはペプチドの定義に固有であることもまた、当業者に十分に理解される。従って、生物学的機能性等価物タンパク質およびペプチドは、本明細書中において、ほとんどまたはすべてではないが特定のアミノ酸が置換され得るタンパク質およびペプチドとして規定される。当然のことながら、異なる置換を有する複数の異なるタンパク質／ペプチドは、本発明に従って容易に作製および使用され得る。

#### 【0497】

アミノ酸置換は、一般に、アミノ酸側鎖の置換の相対的類似性（例えば、それ



らの疎水性、親水性、電荷、サイズなど）に基づく。アミノ酸側鎖置換のサイズ、形状および型の分析によって、アルギニン、リジンおよびヒスチジンはすべて正に荷電した残基であること；アラニン、グリシンおよびセリンはすべて類似のサイズであること；そして、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンはすべて一般的に類似の形状であることが示される。従って、これらの考察に基づいて、アルギニン、リジンおよびヒスチジン；アラニン、グリシンおよびセリン；ならびにフェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは、本明細書中において、生物学的機能性等価物として規定される。

#### 【0498】

より定量的な変化を生じさせる際に、アミノ酸の疎水親水指数が考慮され得る。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷特徴に基づいて疎水親水指数を指定されており、これらは以下である：イソロイシン（+4.5）；バリン（+4.2）；ロイシン（+3.8）；フェニルアラニン（+2.8）；システイン／シスチン（+2.5）；メチオニン（+1.9）；アラニン（+1.8）；グリシン（-0.4）；トレオニン（-0.7）；セリン（-0.8）；トリプトファン（-0.9）；チロシン（-1.3）；プロリン（-1.6）；ヒスチジン（-3.2）；グルタミン酸（-3.5）；グルタミン（-3.5）；アスパラギン酸（-3.5）；アスパラギン（-3.5）；リジン（-3.9）；およびアルギニン（-4.5）。

#### 【0499】

タンパク質に相互作用性生物学的機能を付与する際の疎水親水アミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野において理解される（K y t e および D o o l i t t l e、1982、本明細書中で参考として援用される）。特定のアミノ酸が、類似の疎水親水指数またはスコアを有する他のアミノ酸の代わりに置換され得、そしてなお類似の生物学的活性を保持することは公知である。疎水親水指数に基づいた変化を生じさせる際に、疎水親水指数が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内である置換が特に好ましく、そして±0.5以内である置換がさらにより特に好ましい。

#### 【0500】

従って、アミノ酸が、類似の親水性値を有する別のアミノ酸の代わりに置換され、そしてなお生物学的に等価なタンパク質を入手し得ることが理解される。米国特許第4,554,101号（本明細書中で参考として援用される）において詳述されるように、以下の親水性値が、アミノ酸残基に指定されている：アルギニン（+3.0）；リジン（+3.0）；アスパラギン酸（+3.0±1）；グルタミン酸（+3.0±1）；セリン（+0.3）；アスパラギン（+0.2）；グルタミン（+0.2）；グリシン（0）；トレオニン（-0.4）；プロリン（-0.5±1）；アラニン（-0.5）；ヒスチジン（-0.5）；システイン（-1.0）；メチオニン（-1.3）；バリン（-0.5）；ロイシン（-1.8）；イソロイシン（-1.8）；チロシン（-2.3）；フェニルアラニン（-2.5）；トリプトファン（-3.4）。

#### 【0501】

親水性値に基づいた変化を生じさせる際に、親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内である置換が特に好ましく、そして±0.5以内である置換がさらにより特に好ましい。

#### 【0502】

##### （C7. 融合タンパク質および組換え発現）

本発明のVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの免疫結合体は、分子生物学技術を使用して、融合タンパク質として容易に調製され得る。任意の融合タンパク質は、本明細書中に記載され、そして当該分野で公知の任意の治療剤を使用して、設計および作製され得る。融合タンパク質技術は、2つの部分が選択的に切断可能なペプチド配列により結合される融合タンパク質を調製するために容易に適合される。現在好ましい融合タンパク質は、エンドスタチンを含む融合タンパク質である。任意の他の治療剤伴う場合エンドスタチンは、抗体の末端またはCDRと別の任意の点に連結され得る。エンドスタチンのような治療剤はまた、「一体化して」調製され得、ここでこれらは、標的化後に薬剤の放出を可能にするために、選択的に切断可能なペプチドに好ましくは付随する。

#### 【0503】

このような目的を達成するための組換えDNA技術の使用は、現在、当業者に

標準的操作である。これらの方法としては、例えば、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、およびインビボ組換え／遺伝的組換えが挙げられる。さらに、DNA合成およびRNA合成は、自動合成装置を使用して実施され得る（例えば、Sambrookら、1989（本明細書中に参考として援用される）に記載される技術を参照のこと）。

#### 【0504】

このような融合タンパク質の調製は、一般的に、所望の融合タンパク質をコードする単一のコード領域を調製するために、第1および第2のDNAコード領域の調製、およびそのような領域をインフレームで機能的に連結または結合することを伴う。本発明の状況において、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3様抗体のDNA配列は、治療剤をコードするDNA配列とインフレームで連結される。構築物のどの部分がN末端領域またはC末端領域として調製されるかが、特に関連するとは一般に考えられない。

#### 【0505】

一旦、所望のコード領域が生成されると、発現ベクターが作製される。発現ベクターは、挿入されたDNA領域の上流に、そのDNAの転写を促進するように作用し、そして従ってコードされる組換えタンパク質の発現を促進するように作用する1つ以上のプロモーターを含む。これが、「組換え発現」の趣意である。

#### 【0506】

VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの免疫結合体のいわゆる「組換え」バージョンを獲得するために、これは組換え細胞内で発現される。原核生物系または真核生物系における発現のためのDNAセグメントの操作は、組換え発現における当業者に一般的公知の技術によって実施され得る。実質的に任意の発現系が、このVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの免疫結合体構築物の発現において使用され得ると考えられる。

#### 【0507】

そのようなタンパク質は、真核生物発現系（例えば、CHO細胞）において首尾良く発現され得る。しかし、E. coli pQE-60のような細菌発現系が、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの免疫結合体の大規模

調製および引き続く精製のために特に有用であると考えられる。cDNAはまた細菌系において発現され、発現されるそのコードタンパク質は $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ユビキチン、Schistosoma japonicumグルタチオンS-トランスフェラーゼなどを伴う融合物として発現され得る。細菌発現は、使用の容易さ、およびそれによって得られる物質の品質に関して、真核生物発現を超える利点を有すると考えられる。

#### 【0508】

微生物発現に関して、組換え宿主細胞における遺伝子の発現と関連して本発明の開示をなおさらに補充する目的のために、米国特許第5,583,013号；同第5,221,619号；同第4,785,420号；同第4,704,362号；および同第4,366,246号が、本明細書中で参考として援用される。

#### 【0509】

組換え的に生成されるVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの免疫結合体物は、ヒト投与のために精製および処方され得る。あるいは、免疫結合体コードする核酸は、遺伝子治療を通して送達され得る。裸の組換えDNAまたはプラスミドが使用され得るが、リポソームまたはベクターの使用が好ましい。特定ウイルスが、レセプター媒介性エンドサイトーシスを介して細胞に進入する能力、および宿主細胞ゲノムに組み込みそして安定的および効率的にウイルス遺伝子を発現する能力は、それらを、哺乳動物細胞内に外来遺伝子を移入させるための魅力的な候補にさせている。本発明における使用のために好ましい遺伝子治療ベクターは、一般的にウイルスベクターである。

#### 【0510】

レトロウイルスは、それらの遺伝子を宿主ゲノム中に組み込むそれらの能力、大量の外来性遺伝物質を移入させるそれらの能力、広範なスペクトルの種および細胞型に感染するそれらの能力、および特定の細胞株にパッケージングされるそれらの能力に起因して、遺伝子送達ベクターとして見込まれている。他のウイルス（例えば、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス（HSV）、サイトメガロウイルス（CMV）、およびアデノ随伴ウイルス（AAV）（例えば、米国特許第

5, 139, 941号(本明細書中で参考として援用される)に記載されるウイルス)。また、遺伝子移入のためのベクターとして作用されるように操作され得る。

#### 【0511】

外来性遺伝物質を受容し得るいくつかのウイルスは、それらが適応し得るヌクレオチドの数、およびそれらが感染する細胞の範囲において限定されるが、これらのウイルスは、遺伝子発現を首尾良くもたすことが実証されている。しかし、アデノウイルスは、それらの遺伝産物を宿主ゲノム中に組込まず、従って遺伝子発現のために宿主の複製を必要としない。これは、迅速な遺伝子発現、効率的な遺伝子発現、異種遺伝子発現についてそれらを理想的に適合させる。複製欠損した感染性ウイルスを調製する技術は、当該分野において周知である。

#### 【0512】

特定のさらなる実施形態において、遺伝子治療ベクターはHSVである。HSVを魅力的なベクターにする因子は、ゲノムの大きさおよび組織化である。HSVは大きいので、複数の遺伝子または発現カセットを組込むことは、より小さな他のウイルス系よりもあまり問題ではない。さらに、変動する性能(例えば、時間的、強度)を有する種々のウイルスコントロール配列の利用能は、他の系におけるよりも高い程度で発現を制御することを可能にする。ウイルスが比較的少数でスプライシングされるメッセージを有し、遺伝子操作をさらに容易にすることもまた有用である。HSVはまた、操作が比較的容易であり、そして高い力価まで増殖され得る。

#### 【0513】

もちろん、ウイルス送達系を使用する際には、所望されない夾雑物(例えば、不完全干渉ウイルス粒子または内毒素、および他の発熱物質)を本質的に含まないようにするために十分にビリオンを精製し、その結果、ベクター構築物を受容する細胞、動物、または個体において不都合な反応を全く引き起こさないことが所望される。ベクターを精製する好ましい手段としては、浮遊密度勾配の使用(例えば、塩化セシウム勾配遠心分離)が挙げられる。

#### 【0514】

## (C 8. 抗体結合体)

VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベース抗体は、「イムノトキシン」を調製するために、抗細胞性薬剤またはネガティブに結合体化され得るか；あるいは凝固を直接的または間接的に刺激して、それによって「コアグリガンド」を形成し得る成分と作動可能に会合され得る。コアグリガンドにおいて、抗体は、直接的または間接的な凝固因子に直接的に連結され得るか、あるいは直接的なまたは間接的な凝固因子を結合し、次いで放出する第2の結合領域に連結され得る。「第2の結合領域」アプローチは、一般に、第2の結合領域として凝血薬結合抗体を使用して、それによって二重特異的な抗体構築物を生じる。二重特異性抗体の調製および使用は、一般に、当該分野において周知であり、そして本明細書中にさらに開示される。

## 【0515】

イムノトキシン、コアグリガンドおよび二重特異性抗体の調製において、組換え発現が用いられ得る。この選択された抗体をコードする核酸配列は、選択された毒素、凝血薬、または第2の結合領域をコードする核酸配列に、インフレーム(in-frame)で結合され、発現ユニットまたはベクターを作製する。組換え発現は、新しい核酸の翻訳を生じ、所望のタンパク質産物を生じる。タンパク質結合リガンドではなく抗体をコードする核酸が用いられるが、組換えアプローチは、本明細書中上記のアプローチと本質的に同じである。

## 【0516】

結合体技術に戻ると、イムノトキシンの調製は、一般に、当該分野において周知である。しかし、特定の利点は、イムノトキシンの調製において、および引き続き臨床での投与のためのそれらの精製においての両方で、特定の好ましい技術の適用を通じて達成され得る。例えば、IgGベースのイムノトキシンが、代表的には、それらのFab'対応物よりも良好な結合能力および遅い血中クリアランスを示すが、Fab'フラグメントベースのイムノトキシンは、一般に、IgGベースのイムノトキシンと比較した場合に、より良好な組織浸透能力を示す。

## 【0517】

さらに、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベース抗体に毒素部分

を結合体化するために首尾よく用いられ得る、多くの型のジスルフィド結合含有リンカーが公知であるが、特定のリンカーは、一般に、薬理学的な特徴および能力の差異に基づいて、他のリンカーよりも好ましい。例えば、立体的に「妨害される」ジスルフィド結合を含むリンカーが、インビボでのそれらのより大きな安定性に起因して好まれ、それによって作用部位での結合の前に毒素部分の放出を防ぐ。

#### 【0518】

VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベース抗体に結合体化され得る、広汎な種々のネガティブ（植物由来の毒素、真菌由来の毒素および細菌由来の毒素（例えば、リシンA鎖または脱グリコシル化A鎖）が、公知である。標的化剤への毒素A鎖の架橋は、特定の場合において、ジスルフィド機能を示す架橋剤を必要とする。このことに対する理由は、不明であるが、一旦この因子が標的細胞にこの毒素を「送達する」と、標的化剤から容易に放出可能である特定の毒素部分に対する必要性に起因するようである。

#### 【0519】

各々の型の架橋剤、ならびに架橋が実行される方法は、得られた結合体の薬力学を変動する傾向がある。最終的には、放出可能な毒素が意図される場合には、意図される作用部位を除く身体中のいたるところ（結合体が良好な「放出」特徴を有することが好ましい点）に見出される条件下でインタクトなままである結合体を有することが所望される。従って、特定の架橋スキーム（特に、使用される特定の架橋試薬および架橋される構造を含む）は、いくらか重要である。

#### 【0520】

融合タンパク質の部分として使用される特定の毒素化合物に依存して、標的化剤に作動可能に結合する抗体および毒素化合物を提供することが必要であり得る。次いで、ループ内のタンパク質分解性切断は、ヘテロダイマーポリペプチドを生じ、ここで抗体および毒素化合物は、1個のジスルフィド結合によってのみ連結されている。このような毒素の例は、リシンA鎖毒素である。

#### 【0521】

特定の他の毒素化合物が利用される場合、非切断性ペプチドスペーサーが、V

E G F R 2 遮断抗 V E G F 抗体または 2 C 3 ベース抗体および融合タンパク質の毒素化合物を作動可能に連結するために提供される。非切断性ペプチドスペーサーと組み合わせて使用され得る毒素は、それ自体、タンパク質分解性切断によって細胞傷害性ジスルフィド結合形態に変換され得る毒素である。このような毒素化合物の例は、P s e u d o n o m a s 外毒素化合物である。

#### 【0522】

化学療法剤（例えば、抗腫瘍薬物、他のサイトカイン、代謝拮抗物質、アルキル化剤、ホルモンなど）を標的化することが所望されるような、標的抗原が、免疫トキシンによる効率的な中毒と一致する経路によって内在化しない場合のような状況が存在し得る。種々の化学療法剤および他の薬理学的薬剤は、現在、抗体に首尾よく結合体化されており、そして薬理学的に機能することが示されている。調査されている例示的な抗腫瘍性因子は、ドキソルビシン、ダウノマイシン、メトトレキセート、ビンブラスチン、および種々の他の因子を含む。さらに、他の因子（例えば、ネオカルジノスタチン（n e o c a r z i n o s t a t i n））、マクロマイシン（m a c r o m y c i n）、トレニモン（t r e n i m o n）および $\alpha$ -アamaniチンの部分が、記載されている。

#### 【0523】

凝固因子が、本発明と組み合わせて使用される場合、抗体に対する任意の共有結合は、その機能的に凝固する部位とは別の部位に作製されるべきである。従って、この組成物は、各々の領域が重要な障害なしにその意図された機能を実行するようにする、任意の作動可能な様式にて「連結される」。従って、この抗体は、V E G F に結合し、そして凝固因子は、血餅化を促進する。

#### 【0524】

##### （C 9．生化学架橋剤）

上記に提供される一般の情報に加えて、V E G F R 2 遮断抗 V E G F 抗体または 2 C 3 ベース抗体は、特定の好ましい生化学架橋剤を使用して、抗細胞性薬剤またはネガティブに結合体化され得る。架橋試薬は、2つの異なる分子の官能基を共に結ぶ分子架橋を形成するために使用される。段階的な様式にて2つの異なるタンパク質を連結するために、所望されないホモポリマー形成を排除するヘテ



ロ二官能性架橋剤が、使用され得る。例示的なヘテロ二官能性架橋剤は、表 B 1  
において参照される。

【0525】

【表 2】

表 B1: ヘテロ二官能性架橋剤

リンカー	以下に対して 反応性	利点および適用	架橋後のスパ-サー アームの長さ
SMPT	第1級アミン スルフヒドリル	・ より大きな安定性	11.2 Å
SPDP	第1級アミン スルフヒドリル	・ チオール化	6.8 Å
LC-SPDP	第1級アミン スルフヒドリル	・ 切断性架橋	15.6 Å
スルホ-LC-SPDP	第1級アミン スルフヒドリル	・ 伸長したスパ-サーアーム	15.6 Å
SMCC	第1級アミン スルフヒドリル	・ 安定なマレイミド 反応基	11.6 Å
スルホ-SMCC	第1級アミン スルフヒドリル	・ 酵素-抗体結合体 ・ H <sup>+</sup> イオンキャリアタンパク質結合体	11.6 Å
MBS	第1級アミン スルフヒドリル	・ 安定なマレイミド 反応基	9.9 Å
スルホ-MBS	第1級アミン スルフヒドリル	・ 水溶性	9.9 Å
SIAB	第1級アミン スルフヒドリル	・ 酵素-抗体結合体	10.6 Å
スルホ-SIAB	第1級アミン スルフヒドリル	・ 水溶性	10.6 Å
SMPB	第1級アミン スルフヒドリル	・ 伸長したスパ-サーアーム	14.5 Å
スルホ-SMPB	第1級アミン スルフヒドリル	・ 酵素-抗体結合体	14.5 Å
EDC/スルホ-NHS	第1級アミン カルボキシル基	・ 伸長したスパ-サーアーム	0
ABH	糖質 非選択的	・ 水溶性 ・ H <sup>+</sup> イオンキャリアタンパク質結合体	11.9 Å

【0526】

ヘテロ二官能性架橋剤は、2つの反応基（一方は、一般に、第1級アミン基（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド）と反応し、そして他方は、一般にチオール基（例えば、ピリジルジスルフィド、マレイミド、ハロゲンなど）と反応する）を含む。第1級アミン反応基を通じて、この架橋剤は、あるタンパク質（例えば、選択された抗体またはフラグメント）のリジン残基と反応し得、このチオール反応基を通じて、第1のタンパク質と既に結び付けられている架橋剤は、他のタンパク質（例えば、凝血薬）のシステイン残基（遊離のスルフヒドリル基）と反応する。

#### 【0527】

従って、組成物は、一般に、架橋の目的に利用可能な官能基を有するか、または有するように誘導体化される。この要件は、広汎な種々の基がこの様式において使用され得るという点で限定的であるとは考えられない。例えば、第一級アミン基または第二級アミン基、ヒドラジド基またはヒドラジン基、カルボキシル基、アルコール基、ホスフェート基、あるいはアルキル化基は、結合および架橋のために使用され得る。

#### 【0528】

架橋剤の2つの反応基の間のスペーサーアームは、種々の長さおよび化学組成を有し得る。より長いスペーサーアームは、結合体成分のより良好な可撓性を可能にし、その一方、架橋におけるいくつかの特定の成分（例えば、ベンゼン基）は、反応基にさらに安定性を、または種々の局面の作用に化学結合の耐性の増大（例えば、還元剤への耐性のジスルフィド結合）を与え得る。ペプチドスペーサー（例えば、L-Leu-L-Ala-L-Leu-L-Ala）の使用もまた、意図される。

#### 【0529】

血中にて合理的な安定性を有する架橋剤が用いられることが好ましい。標的化剤および毒素因子または凝固因子を結合体化するために首尾よく用いられ得る、多くの型のジスルフィド結合含有リンカーが、公知である。立体的に妨害されるジスルフィド結合を含むリンカーが、インビボでより大きな安定性を生じることがを証明し得、このことは、作用部位での結合の前に因子の放出を妨げる。従って

、これらのリンカーは、連結剤の1つの好ましい群である。

### 【0530】

イムノトキシンにおける使用に最も好ましい架橋試薬のうちの1つは、SMP Tである。SMP Tは、隣接するベンゼン環およびメチル基により「立体的に妨害」されているジスルフィド結合を含む、二官能性架橋剤である。ジスルフィド結合の立体障害は、チオレートアニオン（組織および血中に存在し得るグルタチオンのような）による攻撃から結合を保護し、それによって腫瘍部位への結合した薬剤の送達の前に結合体の脱カップリングを防ぐため際に役立つ機能を提供すると考えられる。SMP T剤はまた、本発明の二重特異性リガンドと組み合わせて使用され得ることが意図される。

### 【0531】

多くの他の公知の架橋試薬のように、SMP T架橋試薬は、官能基（例えば、システインのSHまたは第一級アミン（例えば、リジンのε-アミノ基））を架橋する能力を与える。別の可能な型の架橋剤は、切断性ジスルフィド結合（例えば、スルホスクシンイミジル-2-（p-アジドサリチルアミド）エチル-1, 3'-ジチオプロピオネート）を含有する、ヘテロ二官能性感光性フェニルアジドを含む。N-ヒドロキシースクシンイミジル基は、第一級アミノ基と反応し、そしてフェニルアジド（光分解の際）は、任意のアミノ酸残基と非選択的に反応する。

### 【0532】

妨害された（hindered）架橋剤に加えて、妨害されていないリンカーもまた、本明細書に従って用いられ得る。保護されたジスルフィドを含まないかまたは生成しないと考えられる、他の有用な架橋剤には、SATA、SPDPおよび2-イミノチオレンが挙げられる。このような架橋剤の使用は、当該分野において十分に理解されている。

### 【0533】

一旦結合体化されると、この結合体は、非結合体化標的化剤および非結合体化治療剤から、ならびに他の夾雑物から分離される。多数の精製技術が、結合体を臨床上に有用にするに十分な程度の純度の結合体を提供する使用に利用可能であ

る。サイズ分離（例えば、ゲル濾過、ゲル浸透、または液体高速クロマトグラフィー）に基づく精製方法は、一般に、最も有用である。他のクロマトグラフィー技術（例えば、Blue-Sepharose分離）もまた、使用され得る。

#### 【0534】

（C10．生物学的に放出可能なリンカー）

任意の結合部分は、血液において合理的な安定性を有し、疾患部位または腫瘍部位に標的化する前に、付着した薬剤の実質的な放出を予防することが、好ましいけれども、特定の局面において、生物学的に放出可能な結合および／または選択的に切断可能なスペーサーまたはリンカーの使用が、意図される。「生物学的に放出可能な結合」および「選択的に切断可能なスペーサーまたはリンカー」は、循環において合理的な安定性をなお有する。

#### 【0535】

従って、本発明のVEGFR-2遮断抗VEGF抗体（例えば、2C3様抗体）は、生物学的に放出可能な結合を介して1以上の治療剤に結合され得る。ScFvフラグメントは、特定の実施形態において好ましいけれども、VEGFR2遮断抗-VEGF抗体、または「標的抗体もしくは薬剤」の任意の形態は、使用され得、これは、インタクトな抗体を含む。

#### 【0536】

「生物学的に放出可能な結合」または「選択的に加水分解可能な結合」は、唯一または優先的に特定の条件下で、放出可能、切断可能、または加水分解であるすべての結合を含む。これは、米国特許第5,474,765号および同第5,762,918号（各々は、本明細書中で特異的に参考文献として援用される）に記載されるように、ジスルフィド結合およびトリスルフィド結合ならびに酸標識結合が挙げられる。

#### 【0537】

治療剤または治療薬物の本発明の抗体への付着のための酸感応性スペーサーの使用は、特に意図される。このような実施形態において、治療剤または治療薬物は、細胞内の酸区画内で放出される。酸感応性放出は、細胞外で起こり得るが、特定の標識の後、好ましくは腫瘍部位に対して起こることが意図される。特定の

現状で好ましい例としては、酸感応性スパーサーを介してコルヒチンまたはドキシソルビシンに結合された2C3様抗体が挙げられる。抗体の糖質部分を介する付着はまた、意図される。このような実施形態において、治療剤または治療薬物は、細胞内の酸性区画内で放出される。

#### 【0538】

標的抗VEGF抗体はまた、生物学的に放出可能な結合を介して治療剤の付着を可能にする官能基を導入するように誘導され得る。従って、標的抗体は、ヒドラジド基、ヒドラジン基、1級アミン基または2級アミン基において側鎖ターミネートを導入するように誘導され得る。治療剤は、Schiffの塩基結合、ヒドラゾンもしくはアシルヒドラゾン結合またはヒドラジドリンカーを介して結合体化され得る（米国特許第5,474,765号および同第5,762,918号、各々は、本明細書中で参考として特異的に援用される）。

#### 【0539】

米国特許第5,474,765号および同第5,762,918号（各々は、本明細書中で参考として特異的に援用される）に記載されるように、標的抗VEGF抗体は、酵素感応性の1以上の生物学的に放出可能な結合（ペプチド結合、エステル、アミド、リン酸ジエステルおよびグリコシドが挙げられる）を介して治療剤に操作可能に付着され得る。

#### 【0540】

本発明の好ましい局面は、優先的に疾患部位、特に、腫瘍環境内に位置する、ペプチターゼおよび／またはプロテイナーゼに対する少なくとも第1切断部位を含むペプチドリンカーの使用に関する。従って、付着された治療剤の抗体媒介送達は、疾患部位または腫瘍環境内で特異的に切断を生じ、活性薬剤の特異的放出を生じる。特定のペプチドリンカーは、再構築に関する1以上の酵素によって認識される切断部位を含む。

#### 【0541】

ウロキナーゼ、プロウロキナーゼ、プラスミン、プラスミノゲン、TGF $\beta$ 、スタフィロキナーゼ、トロンビン、第IXa因子、第Xa因子またはメタロプロテイナーゼ（例えば、間質性コラゲナーゼ、ゲラチナーゼ、またはストロメラ

イシン) に対する切断部位を含むポリペプチドリンカーは、特に好ましい。米国特許第6、004、555、米国特許第5, 877, 289および米国出願番号08/482, 369 (1998年、10月20日発行、料金支払い済) は、さらなる記載ならびに標的薬剤-治療剤構築 (生物学的に放出可能な結合ならびに選択的に切断可能なリンカーおよびペプチドを含む) を作製かつ使用する方法を可能にする目的のために、本明細書中で参考として特異的に援用される。特に、1999年3月2日に発行された米国特許第5, 877, 289号は、さらなる記載ならびに標的薬剤-治療剤構築 (ウロキナーゼ、プラスミン、トロンビン、第IXa因子、第Xa因子またはメタロプロテイナーゼ (例えば、間質性コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、またはストロメライシン) によって腫瘍環境内で切断される選択的に切断可能なペプチドリンカーを含む) を作製かつ使用する方法を可能にする目的のために、本明細書中で特異的に参考として援用される。

#### 【0542】

現状で好ましい選択的に切断可能なペプチドリンカーは、プラスミンまたはメタロプロテイナーゼ (「マトリックスメタロプロテアーゼ」または「MMP」としても公知である) (例えば、間質性コラゲナーゼ、ゼラチナーゼまたはストロメリシン) に対する切断部位を含むリンカーである。本発明に関して使用され得るさらなるペプチドリンカーとしては、例えば、表B2中に列挙されるリンカーが挙げられる。

#### 【0543】

#### 【表3】

表B2

## 切断可能リンカー配列

切断可能配列の型	アミノ酸配列	配列番号
プラスミン切断可能配列		
プロウロキナーゼ	PRFKIIIGG	15
	PRFRIIGG	16
TGF $\beta$	SSRHRRALD	17
プラスミノゲン	RKSSIIIRMRDVVL	18
スタフィロキナーゼ	SSSFDKGKYKKGDD A	19
	SSSFDKGKYKRGDD A	20
第Xa因子切断可能配列		
	IEGR	21
	IDGR	22
	GGSIDGR	23
MMP切断可能配列		
ゲラチナーゼA	PLGLWA	24
コラゲナーゼ切断可能配列		
仔ウシ皮膚コラーゲン ( $\alpha 1(1)$ 鎖)	GPQG IAGQ	25
仔ウシ皮膚コラーゲン ( $\alpha 2(1)$ 鎖)	GPQG L LGA	26
ウシ軟骨コラーゲン ( $\alpha 1(11)$ 鎖)	G IAGQ	27

(表B2の続き)

ヒト肝臓コラーゲン ( $\alpha 1$ (I I I)鎖)	GPLGIAGI	28
ヒト $\alpha_2$ M	GPEGLRVG	29
ヒトPZP	YGAGLGVV	30
	AGLGVER	31
	AGLGISST	32
ラット $\alpha_1$ M	EPQALAMS	33
	QALAMSAI	34
ラット $\alpha_2$ M	AAYHLVSQ	35
	MDAFLESS	36
ラット $\alpha_1$ (2J)	ESLPVVAV	37
ラット $\alpha_1$ (27J)	SAPAVESE	38
ヒト線維芽細胞コラゲナーゼ (自己分解切断)		
	DVAQFVLT	39
	VAQFVLTE	40
	AQFVLTEG	41
	PVQPIGPQ	42

## (C11. 二重特異性抗体)

二重特異性抗体は、本発明のコアグリガンドおよび組合された抗脈管形成の局面において特に有用である。しかし二重特異性抗体は、一般的に、一本のアームがVEGF（必要に応じて2C3と実質的に同じエピトープ）に結合し、そして二重特異性抗体が治療剤に（一般に抗原結合部位とは異なる部位で）結合する限り、使用され得る。PSおよびPEの両方に結合する二重特異性抗体もまた、使用され得る。



一般に、二重特異性抗体の調製はまた、当該分野において周知である。1つの方法は、一方で、標的抗原に対する特異性を有する抗体を、他方で、（本明細書のように）凝集剤を、別々に調製することを含む。ペプシンの $F(a b' y)_2$ フラグメントを、2つの選択した抗体から調製し、続いて各々を還元し、別々の $F a b' y_{SH}$ フラグメントを提供する。次に、カップリングする2つのパートナーの1つにあるSH基を、*o*-フェニレンジマレイミドのような架橋剤を用いてアルキル化し、遊離のマレイミド基を1つのパートナー上に提供する。次にこのパートナーを、チオエーテル結合の手段によって他方と結合させ、所望の $F(a b' y)_2$ ヘテロ結合体を生成し得る。SPDPまたはプロテインAを用いて架橋を行うか、または三重特異性構築物を調製する他の技術が、公知である。

#### 【0545】

二重特異性抗体を生成する他の方法は、2つのハイブリドーマを融合して、クアドローマ(*quadroma*)を形成することである。本明細書において使用する場合、用語「クアドローマ」は、2つのB細胞ハイブリドーマの融合産物を記載するために使用される。ここで、標準的な技術を用いて、2つの抗体産生ハイブリドーマを融合して、娘細胞を産生し、そして免疫グロブリン遺伝子のクローン型の両方のセットの発現を維持する細胞が、次いで選択される。

#### 【0546】

クアドローマを産生する好ましい方法は、親ハイブリドーマの少なくとも1つの酵素を欠失する変異体の選択を包含する。次に、この第1の変異型ハイブリドーマ細胞株は、その連続する生存を妨げる、例えば、ヨードアセトアミドに致死的に曝露された第2のハイブリドーマの細胞に融合される。細胞融合は、致死的に処理されたハイブリドーマから、その酵素欠失についての遺伝子を獲得することにより、第1のハイブリドーマの救済、および第1のハイブリドーマとの融合を介する第2のハイブリドーマの救済を可能とする。同一のアイソタイプであるが、異なるサブクラスの免疫グロブリンの融合が好ましいが、しかし必要ではない。好ましいクアドローマの単離のための代替的なアッセイが存在すれば、混合されたサブクラスの抗体は、使用可能である。

#### 【0547】

より詳細には、クアドローマの開発およびスクリーニングの1つの方法は、第1の選択されたMAbを分泌するハイブリドーマ株を得る工程、およびこのハイブリドーマを、必須の代謝酵素（ヒポキサンチン／グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT））について欠失させる工程を包含する。ハイブリドーマの欠失変異体を得るために、細胞を、8-アザグアニンの漸増濃度（ $1 \times 10^{-7}$  M～ $1 \times 10^{-5}$  M）の存在下で増殖させる。変異体を、限界希釈によってサブクロニングし、そしてそのヒポキサンチン／アミノプテリン／チミジン（HAT）感受性について試験する。この培養培地は、例えば、10% FCS、2 mM L-グルタミンおよび1 mM ペニシリンーストレプトマイシンを補充したDMEMからなり得る。

#### 【0548】

第2の所望のMAbを産生する相補的なハイブリドーマ細胞株を使用して、標準的な細胞融合技術によって、クアドローマを生成する。手短には、 $4.5 \times 10^7$  のHAT感受性の第1の細胞を、 $2.8 \times 10^7$  HAT耐性の第2の細胞（不可逆的生化学的インヒビターであるヨードアセトアミドの致死用量（リン酸緩衝化生理食塩水中に5 mM）で、融合前に30分間氷上で前処理した）と混合する。細胞融合は、ポリエチレングリコール（PEG）を使用して誘導し、そしてこの細胞を96ウェルのマイクロ培養プレート中にプレートする。クアドローマを、HAT含有培地を使用して選択する。二重特異性抗体含有培養物を、例えば、固相アイソタイプ特異的ELISAおよびアイソタイプ特異的免疫蛍光染色を使用して、同定する。

#### 【0549】

二重特異性抗体を同定するための、1つの同定実施形態において、マイクロタイタープレートのウェル（Falcon、Becton Dickinson Labware）を、親ハイブリドーマ抗体の1つと特異的に相互作用し、そして両方の抗体との交差反応性を有さない試薬で、コートする。プレートを洗浄し、ブロックし、そして試験する上清（SN）を各ウェルに添加する。プレートを室温で2時間インキュベートし、上清を棄て、プレートを洗浄し、そして希釈したアルカリホスファターゼ-抗-抗体結合体を、室温で2時間添加する。プレー

トを洗浄し、そしてホスファターゼ基質（例えば、p-ニトロフェニルホスフェート（Sigma、St. Louis））を各ウェルに添加する。プレートをインキュベートし、3N NaOHを各ウェルに添加して反応を停止し、そしてELISAリーダーを使用して、OD<sub>410</sub> 値を測定する。

#### 【0550】

別の同定実施形態において、ポリリジンを用いて前処理したマイクロタイタープレートを使用して、各ウェルに標的細胞の1つを結合し、次にその細胞を固定化し（例えば、1% グルタルアルデヒドを使用する）、そして二重特異性抗体を、インタクトな細胞に結合するその能力について試験する。さらに、FACS、免疫蛍光染色、イデオタイプ特異的抗体、抗原結合競合アッセイ、および抗体の特徴付けの分野において一般的な他の方法を、本発明の方法と組み合わせて使用し、好ましいクアドローマを同定し得る。

#### 【0551】

クアドローマの単離に続いて、二重特異性抗体を他の細胞性産物から精製する。この精製は、免疫グロブリン精製の分野において当業者に公知の、種々のタンパク質単離手順によって達成され得る。抗体を調製する手段、および特徴付ける手段は、当該分野において周知である（例えば、Antibodies: A Laboratory Manual、1988を参照のこと）。

#### 【0552】

例えば、選択されたクアドローマの上清をプロテインAセファロースカラムまたはプロテインGセファロースカラムを通過させて、IgGを結合させる（アイソタイプに依存する）。次に結合した抗体を、例えば、pH 5.0クエン酸緩衝液を使用して溶出する。BsAbを含む溶出画分を、等張緩衝液に対して透析する。あるいは、溶出液をまた、抗-免疫グロブリンセファロースカラムを通過させる。次に、BsAbを、3.5M 塩化マグネシウムを用いて溶出する。次に、この方法において精製されたBsAbを、例えば、上記の標的細胞のアイソタイプ特異的ELISAおよび免疫蛍光染色アッセイによって、結合活性について試験する。

#### 【0553】

精製されたB s A bおよび親抗体はまた、S D S－P A G E電気泳動と、その後の銀染色またはクマシー染色によって、特徴付け、および単離され得る。この手順は、親抗体の一方が、他方の抗体よりも大きな分子量を有し、B s A bのバンドが2つの親抗体の中間に移動する場合に、可能である。サンプルの還元は、2つの見掛け上異なる分子量を有する重鎖の存在を確認する。

#### 【0554】

##### (D. 薬学的組成物)

本発明の薬学的組成物は、一般に、少なくとも第1のV E G F R 2遮断抗V E G F抗体または2 C 3ベース抗体（薬学的に受容可能なキャリアまたは水性媒体中に、溶解または分散した）の有効量を含む。組み合わせ治療もまた意図され、そして同じ型の基礎をなす薬学的組成物を、単一医薬および組み合わせ医薬の両方について使用し得る。

#### 【0555】

句「薬学的に受容可能、または薬理学的に受容可能」とは、必要に応じて、動物またはヒトに投与された場合、有害な、アレルギー性のまたは他の有害な反応を生じない分子全体または組成物をいう。獣医学的使用、本発明に等しく包含され、そして「薬学的に受容可能な」処方物は、臨床的および／または獣医学的使用の両方のための処方物を含む。

#### 【0556】

本明細書において使用する場合、「薬学的に受容可能なキャリア」としては、任意のおよび全ての、溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤、抗真菌剤、等張剤および吸着遅延剤などが挙げられる。薬学的に活性な物質のための、そのような媒体および薬剤の使用は、当該分野において周知である。任意の従来の媒体または薬剤が、活性成分と不適合である場合を除いて、治療的組成物中でのその使用が意図される。ヒトへの投与のために、調製物は、F D A官庁の生物製剤の基準によって必要とされる、滅菌性、発熱性、一般的安全性および純度の基準を満たすべきである。補助的な活性成分もまた、組成物中に組込まれ得る。

#### 【0557】

「単位用量」処方物は、特定の時機に合わせられた送達に適合される投与成分

の用量または副用量を含む。例えば、例示的な「単位用量」処方物は、日用量もしくは日用量単位もしくは日副用量または週用量もしくは週用量単位もしくは週副用量などを含む処方物である。

#### 【0558】

##### (D1. 注射可能処方物)

本発明のVEGFR2遮断抗VEGF抗体ベース抗体もしくは2C3ベース抗体または免疫結合体は、最もしばしば、非経口投与（例えば、序静脈内、筋肉内、皮下、経皮を介する注射のための処方、またはぜん動投与および腫瘍もしくは疾患部位（腔内投与）中への直接滴下を含む他の経路のための処方）のために処方される。治療剤一標的化剤構築物を活性成分として含有する水性組成物の調製は、本明細書の開示を参照すれば、当業者に公知である。代表的には、そのような組成物は、水溶液または懸濁液のいずれかにおいて、注射可能な薬剤として調製され得る；注射前の液体への添加において、溶液または懸濁液を調製するための使用に適切な固体形態もまた調製され得る；そしてその調製物はまた、乳化され得る。

#### 【0559】

注射での使用に適切な薬学的形態としては、滅菌水溶液または滅菌懸濁液；ゴマ油、ピーナッツオイル、または水性プロピレングリコールを含む処方物；および滅菌注射可能溶液または滅菌注射可能懸濁液の即時調製のための滅菌粉末、が挙げられる。全ての場合において、その形態は、滅菌であるべきであり、そして注射可能性が存在する程度に流動性であるべきである。それは、製造および保存の条件下において安定であるべきであり、そして微生物（例えば、細菌および真菌）の混入作用に対して、保護されるべきである。

#### 【0560】

VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベース抗体または免疫結合体組成物は、中性または塩の形態において、滅菌水性組成物中に処方され得る。遊離の塩基、または薬理学的に受容可能な塩としての溶液は、界面活性剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース）と適切に混合された水中で調製され得る。薬学的に受容可能な塩としては、酸添加塩（タンパク質の遊離のアミノ基を用いて形

成される)、および無機酸(例えば、塩酸またはリン酸)または有機酸(例えば、酢酸、トリフルオロ酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸)などを用いて形成される塩などが挙げられる。遊離のカルボキシ基を用いて形成される塩はまた、無機塩基(例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムまたは水酸化鉄(III))および有機塩基(例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン)などから誘導され得る。

#### 【0561】

適切なキャリアとしては、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど)、それらの適切な混合物、ならびに植物油を含む、溶媒および分散媒体が挙げられる。多くの場合において、等張剤(例えば、糖類または塩化ナトリウム)を含むのが好ましい。適切な流動性は、例えば、コーティング剤(例えば、レシチン)の使用によって、分散の場合において必要とされる粒子サイズの維持によって、および/または界面活性剤の使用によって、維持され得る。

#### 【0562】

貯蔵および使用の通常の下において、全てのそのような調製物は、防腐剤を含有し、微生物の増殖を防ぐべきである。微生物の作用の防止は、種々の抗細菌剤および抗真菌剤(例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなど)によってもたらされ得る。注射可能な組成物の長期の吸収は、遅延型吸収剤(例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン)の組成物中での使用によってもたらされ得る。

#### 【0563】

処方の際、または処方前に、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベース抗体または免疫結合体は、広範に透析され、所望されない低分子物質を除去するか、および/または、適切な場合、所望のビヒクル中へのより容易な処方のために凍結乾燥されるべきである。滅菌の注射可能溶液は、必要とされる量の活性薬剤を、適切な溶媒中に、上記に列挙した他の種々の成分とともに取り込まれ、必要に応じて、その後に濾過滅菌されることにより調製される。一般に、分散剤は、種々の滅菌活性成分を、塩基性分散媒体および上記に列挙される必要とさ

れる他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に取り込まれることにより、調製される。

#### 【0564】

滅菌注射可能溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分、および以前に滅菌濾過されたその溶液由来の任意のさらなる所望の成分の粉末を生じる真空乾燥およびフリーズドライ技術である。

#### 【0565】

本発明に従う適切な薬学的組成物は、一般に、受容可能な薬学的希釈剤または賦形剤（例えば、滅菌水溶液）と混合されたある量のVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベース抗体または免疫結合体を含み、意図される使用に依存して、ある範囲の最終濃度を生じる。調製の技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、Mack Publishing Company、1980（本明細書において参考として援用される）によって例示されるように、一般に当該分野において周知である。エンドトキシンの混入は、安全なレベルに最小限に維持されるべきである（例えば、0.5 ng/mgタンパク質未満）ことを理解するべきである。さらに、ヒトへの投与について、調製物は、FDA官庁の生物製剤基準によって必要とされる、滅菌性、発熱性、一般的安全性および純度の基準を充たすべきである。処方の際に、抗体または免疫結合体溶液は、投薬量処方と適合する様式において、およびそのような治療的有效量において、投与される。

#### 【0566】

（D2. 徐放性処方物）

VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベース抗体または免疫結合体溶液の処方物は、種々の投薬形態（例えば、上記の注射可能な溶液の型）において容易に投与されるが、他の薬学的に受容可能な形態（例えば、錠剤、ピル、カプセルまたは経口投与のための他の固体、座剤、膣坐薬、経鼻溶液またはスプレー、エアロゾル、吸入剤、リポソーム形態など）もまた意図される。投与形態の型は、処置される疾患または障害に適合される。

#### 【0567】

薬学的「遅放性」カプセルまたは「徐放性」組成物または調製物が、使用され得、そして一般的に適用可能である。徐放性処方物は、一般に、長期間にわたって一定の薬物レベルを生じるように設計され、そして本発明に従う V E G F R 2 遮断抗 V E G F 抗体または 2 C 3 ベース抗体または免疫結合体を送達するために使用され得る。

#### 【0568】

徐放性調製物の適切な例としては、抗体または免疫結合体を含む固形疎水性ポリマーの半浸透性マトリックスが挙げられ、これらのマトリックスは、成形された物品（例えば、フィルムまたはマイクロカプセル）の形態である。徐放性マトリックスの例としては、以下が挙げられる：ポリエステル；ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール））；ポリラクチド（例えば、米国特許第3,773,919号）；L-グルタミン酸およびγエチルL-グルタメートのコポリマー；非分解性エチレン-酢酸ビニル；分解性乳酸-グリコール酸コポリマー（例えば、Lupron Depot™（乳酸-グリコール酸コポリマーおよびロイプロリドアセテートからなる注射可能なミクロスフェア））；およびポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸。

#### 【0569】

エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸のようなポリマーは、分子を100日間にわたって放出し得、特定のヒドロゲルは、タンパク質をより短期間で放出する。カプセル化抗体が身体内に長時間残留する場合、37℃で湿気に曝露される結果としてこれらは変性または凝集し得、従って生物学的活性を減少し、かつ／または免疫原性を变化する。合理的な戦略は、関与する機構に依存した安定化に利用可能である。例えば、凝集機構がチオージスルフィド相互変換を介した分子間S-S結合形成に関与する場合、安定化は、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加物の使用、特定のポリマーマトリックス組成物の開発などによって達成される。

#### 【0570】

（D3．リポソームおよびナノカプセル）



特定の実施形態において、リポソームおよび／またはナノカプセルもまた、VEGF R2遮断抗VEGF抗体または2C3ベース抗体または免疫結合体とともに使用され得る。リポソームの処方および使用は、以下に要約されるように、当業者に、一般に公知である。

#### 【0571】

リポソームは、水性媒体中に分散されるリン脂質から形成され、そして自発的に多層の同心の二重層ビヒクル（多層ビヒクル（MLV）とも称する）を形成する。MLVは、一般に、25 nm～4  $\mu$ mの直径を有する。MLVの超音波処理は、中心に水溶液を含有する、直径200～500 Åの範囲の小さな単層のビヒクル（SUV）を生じる。

#### 【0572】

リン脂質は、水中に分散される場合、水に対する脂質のモル比に依存して、リポソーム以外の多様な構造を形成し得る。低い比において、リポソームは、好ましい構造である。リポソームの物理学的特徴は、pH、イオン強度、および二価カチオンの存在に依存する。リポソームは、イオンおよび極性物質に対する低い透過性を示し得るが、高温において、その透過性を顕著に変化させる相転移を受ける。相転移は、ゲル状態として公知の密接に充填された、規則正しい構造から、流体状態として公知の疎に充填された、より規則正しくない構造への変化を含む。これは、特徴的な相転移温度において生じ、そしてイオン、糖および薬物の透過性を増加する。

#### 【0573】

リポソームは、4つの異なる機構を通じて、細胞と相互作用する：マクロファージおよび好中球のような細網内皮系の食細胞によるエンドサイトーシス；非特異的な弱い疎水的な力、もしくは静電的な力のいずれかによるか、または細胞表面成分との特異的な相互作用による細胞表面への吸着；リポソーム含有物の細胞質への同時放出をとともう、リポソームの脂質二重層の形質膜への挿入による形質細胞膜との融合；および、リポソームの内容物の会合をいずれもともなわない、リポソーム脂質の、細胞膜または細胞内（オルガネラ）膜への移入、あるいはその逆。1つより多い機構が同時に作動し得るが、リポソームの処方を変化させ

ることは、作動する機構を変更し得る。

#### 【0574】

ナノカプセルは、一般に、安定にかつ再現性のある方法において、化合物を捕獲し得る。細胞内へのポリマー性の過剰負荷に起因する副作用を避けるために、そのような超微細粒子（約0.1  $\mu\text{m}$ のサイズ）が、インビボで分解され得るポリマーを使用して設計されるべきである。これらの要求を満たす生分解性ポリアルキルシアノアクリレートナノ粒子は、本発明における使用において意図され、そしてそのような粒子は、容易に作製され得る。

#### 【0575】

##### （D4. 眼性処方物）

血管原性成分を有する多くの疾患は、眼に関する。例えば、本発明に従って処置され得る、角膜新生血管形成に関する疾患としては、糖尿病網膜症、未熟児網膜症、角膜移植片拒絶、血管新生緑内障および水晶体後線維増殖症、流行性角結膜炎、ビタミンA欠乏症、コンタクトレンズ過剰装着、アトピー性角膜炎、上輪部角膜炎、翼状角膜炎症候群、シェーグレン、酒性挫瘡、フリクテン症（*phlyctenulosis*）、梅毒、マイコバクテリア感染、脂質変性、化学的焼灼、微生物潰瘍、真菌潰瘍、単純疱疹感染、帯状疱疹感染、カポジ肉腫、モーレン潰瘍、テリエン辺縁変性、辺縁角質溶解、外傷、リウマチ様動脈炎、全身性狼瘡、多発性動脈炎、ヴェーゲナー類肉腫症、強膜炎、スティーヴンズ・ジョンソン疾患、天疱瘡（*periphigoïd*）放射状角膜切開、ならびに角膜移植片拒絶が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0576】

本発明に従って処置され得る、網膜／脈絡膜新生血管形成に関する疾患は、糖尿病性網膜症、黄斑変性、鎌状赤血球貧血、類肉腫、梅毒、弾性線維性仮性黄色腫、パジェット病、静脈閉鎖、動脈閉鎖、頸動脈閉塞性疾患、慢性ブドウ膜炎／ビトリティス（*vitritis*）、マイコバクテリア感染、ライム病、全身性エリトマトーデス、未熟児網膜症、イールズ病、ベチュット病、網膜炎または脈絡膜炎を引き起こす疾患、推定眼ヒストプラスマン症、ベスト病、近視、視神経乳頭欠損、スターガート疾患、パースプラニティス（*pars planitis*）

s)、慢性網膜剥離、過粘稠度症候群、トキソプラズマ症、外傷およびレーザー後合併症が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0577】

本発明に従って処置され得る他の疾患としては、皮膚潮紅（角の新生血管形成）および血管結合組織または繊維質組織の異常増殖（糖尿病に関係してもしなくても、増殖性硝子体網膜症のすべての形態を含む）によって引き起こされる疾患が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0578】

従って、本発明のVEGFR2遮断抗VEGF抗体ベースの抗体および2C3ベースの抗体ならびに免疫結合体は、眼性溶液として使用するために適切な薬学的組成物の調製において有利に使用され得、この薬学的組成物は、硝子体内および／または房内（intracameral）投与のための組成物を含む。前述の障害または他の障害の処置のために、本発明のVEGFR2遮断組成物、抗VEGF抗体組成物または2C3ベースの抗体組成物のいずれかは、従来の薬学的慣行（例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15編、1488～1501頁（Mack Publishing Co., Easton, PA）を参照のこと）に従って調製された眼性調製物の形態で処置の必要な非験体の眼に投与される。

#### 【0579】

眼性調製物は、薬学的に受容可能な溶液、懸濁液または軟膏中に約0.01～1重量%、好ましくは約0.05～約0.5重量%の濃度でVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体を含む。濃度のいくらかの変更は、使用する特定の化合物、処置される被験体の状態などに依存して必要に生じ、そして処置の担当者は、個々の被験体について最も適切な濃度を決定する。眼性調製物は、好ましくは、滅菌水溶液の形態であり、所望の場合、さらなる成分、例えば、防腐剤、緩衝液、弾力剤、酸化防止剤および安定剤、非イオン性湿潤剤または浄水剤、粘性増加剤などを含む。

#### 【0580】

このような溶液において使用するための適切な防腐剤としては、塩化ベンズア

ルコニウム、塩化ベンズエトニウム、クロロブタノール、チメロサルなどが挙げられる。適切な緩衝液としては、約pH6とpH8との間、好ましくは、約pH7とpH7.5との間のpHを維持するために十分な量の、ホウ酸、炭酸水素ナトリウムおよびカリウム、ホウ酸ナトリウムおよびカリウム、炭酸ナトリウムおよびカリウム、酢酸ナトリウム、ビリン酸(biphosphate)ナトリウムなどが挙げられる。適切な弾力剤は、デキストラン40、デキストラン70、デキストロース、グリセリン、塩化カリウム、プロピレングリコール、塩化ナトリウム、などであり、眼性溶液の塩化ナトリウム当量は、 $0.9 \pm 0.2\%$ の範囲である。

#### 【0581】

適切な酸化防止剤および安定剤としては、亜硫酸水素ナトリウム、二亜硫酸水素ナトリウム、チオ亜硫酸ナトリウム、チオ尿素などが挙げられる。適切な湿潤剤および浄水剤としては、ポリソルベート80、ポリソルベート20、ポロキサマー282およびチロキサポールが挙げられる。適切な粘性増加剤としては、デキストラン40、デキストラン70、ゼラチン、グリセリン、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシメチルプロピルセルロース、ラノリン、メチルセルロース、ペトロラタム、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースなどが挙げられる。眼性調製物は、例えばドロップの形態で従来の方法によってか、または眼性溶液中に眼を浸すことによって処置の必要な被験体の眼に局所的に投与される。

#### 【0582】

(D5. 局所処方物)

広範な意味で、局所投与のための処方物は、口(頬側)を介してかつ皮膚を通して送達するための処方物を含む。「局所送達システム」はまた、投与される成分を含む経皮的パッチを含む。皮膚を通ず送達は、所望の場合、イオン注入または電気的運搬によってさらに達成され得る。

#### 【0583】

口において局所投与するための適切な処方物は、風味のある基礎原料の成分、通常は、ショ糖およびアカシアまたはトラガカントを含むロゼンジ；不活性基礎

原料（例えば、ゼラチンおよびグリセリン）の活性成分またはショ糖およびアシアを含む香錠；ならびに適切な液体キャリアで投与される成分を含むうがい薬が挙げられる。

#### 【0584】

皮膚に局所投与するための適切な処方物としては、軟膏、クリーム、ゲルおよび泥膏（薬学的に受容可能なキャリアで投与される成分を含む）が挙げられる。局所使用（例えば、クリーム、軟膏およびゲルで）のためのVEGF R2-遮断抗VEGFまたは2C3ベース抗体の処方物としては、当該分野で周知のような、脂肪性基剤または水溶性軟膏剤の調製物が挙げられる。例えば、これらの組成物は、野菜オイル、動物性脂肪、が挙げられ、そしてより好ましくは、石油から得た半個体炭化水素が挙げられ得る。使用される特定の成分は、白色軟膏、黄色軟膏、セチルエステルワックス、オレイン酸、オリーブオイル、パラフィン、ペトロラタム、白色ペトロラタム、鯨蠟、グリセリンデンブ、白色ワックス、黄色ワックス、ラノリン、無水ラノリンおよびモノステアリン酸グリセリルが挙げられ得る。種々の水溶性軟膏剤が、使用され得、グリコールエーテルおよび誘導体、ポリエチレングリコール、ポリオキシシル40ステアレート、ならびにポリソルベートが挙げられる。

#### 【0585】

直腸投与のための処方物は、適切な塩基（例えば、ココアバターまたはサリチレートを含む）とともに坐剤として与えられ得る。瘻投与のための適切な処方物は、さらなる活性成分（例えば、当該分野で適切であると知られるキャリア）を含む、ペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、泥膏、包状物、またはスプレー処方物として与えられ得る。

#### 【0586】

##### （D6．鼻性処方物）

鼻経路および呼吸器経路を介する局所送達は、種々の状態を処置するために意図される。これらの送達経路はまた、薬剤を全身性循環に送達するために適切である。従って、鼻性投与のための適切なキャリアにおける活性成分の処方物は、本発明内に含まれ、例えば、鼻性溶液、スプレー、エアロゾルおよび吸入抗原が

挙げられる。キャリアが個体である場合、処方物は、例えば、20～500ミクロンの範囲の粒子サイズを有する粗散剤が挙げられ、例えば、鼻に近接して維持される散剤のコンテナから鼻経路を通る急速な吸入によって投与される。

#### 【0587】

キャリアが液体である適切な処方物は、鼻投与において有用である。鼻溶液は、通常は、ドロップまたはスプレーで鼻経路に投与されるように設計される水溶液であり、そしてそれらが、多くの局面において鼻分泌と類似であり、通常の線毛作用が維持されるように調製される。従って、鼻水溶液は、通常、等張性であり、そして5.5～6.5のpHを維持するようにわずかに緩衝化される。さらに、必要な場合、眼性調製物において使用される防腐剤と類似の抗菌防腐剤および適切な薬物安定剤は、処方物中に含まれ得る。種々の市販の鼻性調製物は、公知であり、そして例えば、抗生物質および抗ヒスタミン剤が挙げられ、ぜん息予防に使用される。

#### 【0588】

吸入薬および吸入剤は、薬物または化合物の患者の呼吸樹への送達のために設計される薬学的調製物である。蒸気または霧が、投与され、そして有効領域に到達する。この経路はまた、薬剤を全身性循環に送達するために使用され得る。吸入薬は、鼻または口呼吸性経路によって投与され得る。吸入薬溶液の投与は、この液滴が十分に良質でかつサイズが均一であり、その結果、この霧が、細気管支に到達する場合にのみ、有効である。

#### 【0589】

製品の別のグループ（吸入薬としても公知であり、そして時には、吸入剤といわれる）は、特異的送達システムの使用によって呼吸経路に運ばれる良質の散剤薬物または液体薬物（例えば、薬学的エアロゾル）を含み、液体ガス噴霧剤中に薬物の溶液または懸濁液を維持する。適切なバルブおよび口アダプターを通して放出される場合、吸入薬の測定用量は、患者の呼吸路に進められる。粒子サイズは、この型の調製物の投与において主に重要である。肺腔への穿通のための最適粒子サイズは、0.5～7  $\mu\text{m}$ のオーダーであると、報告されてきた。良質の霧は、加圧エアロゾルによって産生され、それによって、それらの使用の利点が、

考慮される。

#### 【0590】

##### (E. 治療用キット)

本発明はまた、本発明の処置方法における使用のためのVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベース抗体または免疫結合体を含む治療用キットを提供する。そのようなキットは、一般に、適切な容器手段において、少なくとも1つのVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベース抗体または免疫結合体の薬学的に受容可能な処方物を含有する。このキットはまた、診断／造影または組み合わせ治療のいずれかのための、他の薬学的に受容可能な処方物を含む。例えば、そのようなキットは、化学治療剤または放射線治療剤；抗脈管形成剤；抗腫瘍細胞抗体；および／あるいは抗腫瘍脈管構造性または抗腫瘍支質性のイムノトキシンまたはコアグリガンドのある範囲の任意の1つ以上を含み得る。

#### 【0591】

このキットは、任意のさらなる成分を含むか、または含まないVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベース抗体または免疫結合体を含む1つの容器（容器手段）を有し得るか、あるいは各所望の薬剤のために別々の容器を有し得る。組み合わせ治療剤が提供される場合、単一の溶液が、モル等価の組み合わせにおいてか、または1つの成分が他の成分より過剰においてのいずれかで、予め混合され得る。あるいは、キットの各VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベース抗体または免疫結合体および他の抗癌剤成分は、患者への投与前に、異なる容器中で別々に維持され得る。

#### 【0592】

このキットの成分が、1つ以上の液体中で提供される場合、液体は、好ましくは、水溶液であり、特に滅菌水溶液が好ましい。しかし、このキットの成分は、乾燥粉末において提供され得る。試薬または成分が乾燥粉末として提供される場合、この粉末は、適切な溶媒の添加によって再構成され得る。この溶媒もまた別の容器中で提供され得ることが意図される。

#### 【0593】

キットの容器は、一般に、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、ボ

トル、シリンジ、または他の容器手段を含み、これらの中でVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベース抗体または免疫結合体および任意の他の所望の薬剤が、好ましくは適切なアリコートで、配置され得る。別々の成分が含まれる場合、このキットはまた、一般に第2のバイアルまたは他の容器を含み、これらの中にこの成分が配置され、別々に設計された用量での投与を可能にする。このキットは、滅菌の、薬学的に受容可能な緩衝液または他の希釈剤を含むための第2／第3の容器手段もまた、含み得る。

#### 【0594】

このキットはまた、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベース抗体または免疫結合体を動物または患者に投与するための手段（例えば、1つ以上の針またはシリンジ、あるいは点眼剤、ピペット、または他のそのような装置）を含み、その手段によって、この処方物が、動物に注入され得るか、または身体の疾患領域に適用され得る。本発明のキットはまた、代表的に、バイアルなど、および他の成分を、市販のために密接な拘束において含む手段（例えば、射出成形またはブロー成形したプラスチック容器）を含み、これらの手段の中で、所望のバイアルおよび他の装置が配置され、そして保持される。

#### 【0595】

##### （F．抗脈管形成治療）

本発明は、例えば、種々の疾患および障害に寄与する、異常な脈管形成を有する動物および患者を処置するために、使用され得る。これらのうちで最も普及した、および／または臨床的に重要なものは、癌処置の分野以外に、以下を含む：関節変形、慢性関節リウマチ、乾癬、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性網膜症、加齢性黄斑変性、グレーブズ病、血管性再狭窄（以下の再狭窄を含む：血管形成術、動静脈機能不全（AVM）、髄膜腫、血管腫および血管新生緑内障）。介入についての他の潜在的な標的には、以下が挙げられる：血管線維腫、アテローム性動脈硬化症斑、角膜移植新生血管形成、血友病性関節、肥大性瘢痕、オースラーウェーバー症候群、化膿性肉芽腫水晶体後線維増殖症、強皮症、トラコーマ、脈管接着、滑膜炎、皮膚炎、種々の他の炎症性疾患および障害、ならびに子宮内膜症。本発明によって処置可能なさらなる疾患および障害、ならびにこのよ



うな脈管形成障害の統一的な基礎が、以下に記載される。

【0596】

新脈管形成が関連する1つの疾患は、慢性関節リウマチであり、ここで、関節の滑膜内壁における血管は、新脈管形成を起こす。新しい脈管ネットワークの形成に加えて、内皮細胞は、パンプス増殖および軟骨破壊に導く、因子および反応性酸素種を放出する。新脈管形成に関連する因子は、慢性関節リウマチの慢性的な炎症状態に能動的に寄与し、そして維持するのを助け得る。新脈管形成に関連する因子はまた、変形性関節症において役割を有し、関節の破壊に寄与する。

【0597】

Haradaら（1998、本明細書中で参考として具体的に援用される）は、VEGFが、慢性関節リウマチの病因に関係し、そしてさらに、VEGFの血清濃度の測定が、慢性関節リウマチの疾患活性をモニターするための、非侵襲性の有用な方法であることを示した。このことは、慢性関節リウマチと関連する本発明の治療的用途および診断的用途を支持する。

【0598】

Nagashimaら（1999、具体的に、本明細書中で参考として援用される）は、培養されたりウマチ滑膜細胞におけるVEGFに対する抗リウマチ薬物の阻害効果を記載する。VEGFは、慢性関節リウマチの滑膜において恒常的に発現される。公知の抗リウマチ薬物（ブシラミン（BUC））は、その作用機構内に、滑膜細胞によるVEGF産生の阻害を含むことが示されている。従って、BUCの抗リウマチ効果は、滑膜細胞によるVEGF産生の阻害を介して、リウマチ滑膜における新脈管形成および滑膜増殖の抑制によって媒介される。抗リウマチ治療としての本発明の使用は、この現存する治療薬のVEGF阻害作用によって支持される。

【0599】

新脈管形成によって媒介される疾患の別の例は、眼血管新生疾患である。この疾患は、眼の構造（例えば、網膜または角膜）への新しい血管の侵入によって特徴付けられる。それは、失明に最も一般的な原因であり、そして約20の眼の疾患に関係する。加齢性黄斑変性において、関連した視覚問題は、網膜色素上皮の

真下での維管束組織の増殖を有するブルー膜における欠陥を介する脈絡膜毛細管の内殖によって引き起こされる。脈管形成損傷はまた、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、角膜移植拒絶、血管新生緑内障および水晶体後線維増殖症と関連する。

#### 【0600】

角膜新生血管形成に関連する他の疾患には、以下が挙げられるが、これらに限定されない：流行性角結膜炎、ビタミンA欠損、コンタクトレンズ過剰装着（overwear）、萎縮性角膜炎、上輪部角膜炎、翼状角膜炎乾燥症、シェーグレン症（sjogrens）、しゅさ性挫瘡、フリクテン症（phlyctenulosis）、梅毒、マイコバクテリア感染、脂質変性、化学的やけど、細菌性潰瘍、真菌性潰瘍、単純疱疹感染、带状疱疹感染、原虫感染、カポジ肉腫、モーレン潰瘍、テリエン辺縁変性、辺縁角膜炎、慢性関節リウマチ、全身性狼瘡、多発性動脈炎、外傷、ヴェーゲナー類肉腫症、強膜炎、スティーヴンズジョンソン疾患、脈絡放射状角膜切開、および角膜移植片（graph）拒絶。

#### 【0601】

網膜／脈絡膜新生血管形成に関連する疾患には、以下が挙げられるが、これらに限定されない：糖尿病性網膜症、黄斑変性、鎌状赤血球貧血、サルコイド、梅毒、弾性線維性仮性黄色腫、パジェット病、静脈閉鎖、動脈閉鎖、頸動脈閉塞性疾患、慢性ブドウ膜炎／硝子体炎（vitritis）、マイコバクテリア感染、ライム病、全身性エリテマトーデス（erythematosis）、未熟児網膜症、イールズ病、ベチェット病（Behets disease）、網膜症または脈絡膜炎を引き起こす感染、推定眼ヒストプラスマ症、ベスト病、近視、視神経乳頭の先天的な構造上の欠損、シュタルガルト病、扁平部炎、慢性網膜剥離、過粘稠度症候群、トキソプラスマ症、外傷およびレーザー処置後の合併症。

#### 【0602】

他の疾患には、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ルベオーシス（角の新生血管形成）に関連する疾患、および増殖性硝子体網膜症の全ての形態を含む維管束組織または線維性組織の異常増殖によって引き起こされる疾患。

**【0603】**

慢性炎症はまた、病理学的新脈管形成に関連する。潰瘍性大腸炎およびクローン病のようなこのような疾患状態は、新しい血管の炎症性組織への内殖とともに、組織学的変化を示す。南アメリカに見出されるバルトネラ症（細菌性感染）は、脈管内皮細胞の増殖によって特徴付けられる慢性的な段階を生じ得る。

**【0604】**

新脈管形成に関連する別の病理学的役割は、アテローム性動脈硬化症に見出される。血管の管腔内に形成されるプラークは、脈管形成刺激活性を有することが示されている。ヒト冠動脈硬化性病変におけるVEGFの発現は、Inoueら（1998、具体的に、本明細書中で参考として援用されている）によって立証されている。このことは、ヒト冠状動脈硬化の進行において、および閉塞性冠疾患における再疎通プロセスにおけるVEGFの病態生理学的重要性を明らかにする。本発明は、このような状態のための有効な処置を提供する。

**【0605】**

小児期の最も頻繁な脈管形成疾患の1つは、血管腫である。ほとんどの場合において、腫瘍は良性であり、そして介入なく退行する。より重篤な場合において、腫瘍は、大きな空洞性かつ浸潤性の組織に進行し、そして臨床的な合併症を作り出す。血管腫の全身的な形態である、血管腫症（hemangiomatosis）は、高い死亡率を有する。現在使用される治療法を用いて処置され得ない治療耐性血管腫が存在する。

**【0606】**

新脈管形成はまた、オースラー-ウェーバー-ランデュ病、つまり遺伝性出血性毛細管拡張症のような遺伝性疾患に見出される損傷についての原因である。これは、血管またはリンパ管の複数の小さな血管腫、腫瘍によって特徴付けられる遺伝疾患である。血管腫は、皮膚および粘膜に見出され、しばしば、鼻出血（鼻血）または胃腸出血によって、ならびにときどき肺および肝動静脈瘻を伴って生じる。

**【0607】**

新脈管形成はまた、生殖および創傷治癒のような通常の生理学的プロセスに関

係する。新脈管形成は、排卵、およびまた、受精後の胞胚の着床において重要な工程である。新脈管形成の阻止により、排卵をブロックするために、または胞胚による着床を防止するために無月経を誘導し得る。

#### 【0608】

創傷治癒において、過剰修復または線維増殖症は、外科手順の有害な副作用であり得、そして新脈管形成によって引き起こされ得るか、または悪化され得る。接着は、手術の頻繁な合併症であり、そして小腸閉塞症のような問題に導く。

#### 【0609】

所望でない脈管浸透性によって特徴付けられる疾患および障害はまた、本発明によって処置され得る。これらは、脳腫瘍と関連した水腫、悪性疾患と関連した腹水、メグズ症候群、肺炎症、ネフローゼ症候群、心内膜液浸出および胸水を含み、WO 98/16551に開示され、本明細書中で参考として援用される。

#### 【0610】

以下の節に記載されるように、先の疾患および障害の各々は、全ての型の腫瘍とともに、例えば、米国特許第5,712,291号（具体的に、本明細書中で参考として援用される）に記載されるように、当該分野の知識にしたがって、本発明によって効果的に処置され、統合された利益が、脈管形成疾患の処置への抗脈管形成ストラテジーの適用から生じる。

#### 【0611】

本発明の抗体および／または免疫結合体は、最も好ましくは、腫瘍の処置において利用される。新脈管形成が重要である腫瘍は、悪性腫瘍および良性腫瘍を含み、例えば、神経腫、神経線維腫、トラコーマおよび化膿性肉芽腫である。新脈管形成は、固形腫瘍形成および転移において、特に顕著である。しかし、新脈管形成はまた、血液生成腫瘍（blood-born tumor）（例えば、白血病）、および白血球の非制限増殖が起こる骨髓の種々の急性または慢性の腫瘍性疾患（通常、貧血、障害性血液凝固、およびリンパ節、肝臓および脾臓の膨大を伴う）に関連する。新脈管形成はまた、白血病様の腫瘍を生じる、骨髓における異常において役割を果たす。

#### 【0612】

新脈管形成は、腫瘍転移の2つの段階において重要である。一次腫瘍の血管新生において、新脈管形成は、細胞が、血液流に入ること、そして身体内を循環することを可能にする。腫瘍が一次部位を離れ、そして二次の転移部位に定着した後、新管脈形成は、新しい腫瘍が増殖し得、そして拡大する前に、生じなくてはならない。従って、新脈管形成の防止は、腫瘍の転移を妨げ得、そして1次部位における腫瘍性増殖を含み得、他の治療法、特に、治療剤—標的化薬剤構築物による処置を可能にする（以下を参照のこと）。

#### 【0613】

本発明によって提供されるVEGFR2遮断抗VEGF抗体および2C3ベース抗体法または免疫結合体法は、従って、脈管成分を有する任意の悪性腫瘍の処置に広範囲に適用可能である。腫瘍、特に血管新生化された、悪性腫瘍の処置に、本発明の抗体および／または免疫結合体を使用する際に、薬剤は、単独でか、または例えば、化学療法剤、放射線療法剤、アポトーシス剤、抗脈管形成剤および／あるいはイムノトキシンまたはコアグリガンド（coaguligand）と組み合わせて使用され得る。

#### 【0614】

処置のための代表的な血管新生化腫瘍は、固形腫瘍、特に癌であり、これらは酸素および養分の供給のために、脈管成分を必要とする。本発明を使用して処置され得る例示的な固形腫瘍としては、肺、胸部、卵巣、胃、膵臓、喉頭、食道、精巣、肝臓、耳下腺、胆管、結腸、直腸、頸部、子宮、子宮内膜、腎臓、膀胱、前立腺、甲状腺の腫瘍、扁平上皮癌、腺癌、小細胞癌腫、メラノーマ、グリオーム、神経芽細胞腫などが挙げられるが、これらに限定されない。WO 98/45331は、抗VEGF抗体を使用して、効果的に処理され得る種々の腫瘍型をさらに例示するために、本明細書中で参考として援用される。

#### 【0615】

腫瘍の維持および転移における新脈管形成の役割の知識は、乳癌のような癌に対する予後インディケーターに導く。一次癌に見出される新生血管形成の量は、侵襲性乳癌において最も激しい新生血管形成の範囲における微小血管密度を計測することによって決定された。高レベルの微小血管は、腫瘍再発と相関すること

が見出された。本発明の治療による新脈管形成の制御は、このような腫瘍の再発を減少するか、または打ち消す。

#### 【0616】

本発明は、固形腫瘍が存在する任意の患者の処置における使用に対して考慮される。VEGFR2遮断抗VEGF抗体ベースの組成物の特定の特性の観点から、本発明の治療剤は、減少した副作用を有する。特定の利点は、マクロファージによって媒介され、そして骨組織に対する不利な効果を欠く、腫瘍に対する宿主免疫応答の維持または増強を生じる。本発明は、従って、小児癌および骨粗しょう症および他の骨欠損症を有するか、またはこれらが進行する危険性のある患者の処置のための選択の抗脈管形成治療であり得る。

#### 【0617】

全ての悪性疾患および固形腫瘍は、本発明によって処置され得るが、本発明の非結合体化VEGFR2遮断抗VEGF抗体および2V3抗体は、より脈管形成的な腫瘍を有する患者、または転移の危険性を有する患者の処置における使用のために、特に考慮される。

#### 【0618】

本発明はまた、予防的 (preventative) 処置または予防 (prophylactic) 処置として意図される。本発明のこれらの局面は、本発明が、転移性腫瘍の播種の早い段階において転移性癌または腫瘍細胞を有し得る、一次腫瘍を提示する患者を処置する能力を含む。抗脈管形成戦略として、本発明はまた、腫瘍の進行に対して中程度または高度の危険性の被験体の腫瘍進行を防止するために使用され得、予後試験および／または遺伝性癌に苦しむ近親類に基づく。

#### 【0619】

本発明のVEGFR2遮断抗VEGF抗体および2V3抗体の結合体化形態またはイムノトキシン形態は、固形腫瘍を破壊または脱バルク化 (de-bulking) における使用について、特に考慮される。本発明のこれらの局面は、本発明の非結合体化抗脈管形成抗体とともに、または他の抗脈管形成アプローチとともに使用されうる。

## 【0620】

本発明の処置方法の免疫結合体およびプロドラッグ形態は、以下の2つの特性を有する単一の治療剤を提供する別の利点を有することが当業者に明らかである：抗体の固有の抗脈管形成特性および取り付けられた薬剤の治療特性（例えば、細胞毒性、凝固性、アポトーシス性など）。従って、本発明の抗体の結合体化およびプロドラッグ処置形態は、癌治療の分野にわたって信じられないほどの広範な有用性を有する。

## 【0621】

本発明の異なる局面と関係する使用についてより適切な患者に関して本明細書中に提供されるガイダンスは、特定の患者のプロフィールが、本発明による処置についての患者の選択を補助し得るという教示として意図される。特定の患者の予備選択、または患者のカテゴリーは、血管新生化腫瘍、または上記のような他の脈管形成疾患を有する全ての患者の処置に関係する本発明の有用性を、いかなる方法でも否定しない。さらなる考慮は、本発明によって提供される腫瘍に対する攻撃が、腫瘍をさらなる治療処置を受けやすくさせ、その結果、引き続く処置は全体的な相乗効果を生じるか、完全な寛解または治癒を導きさえする。

## 【0622】

任意の特定の型の腫瘍が本発明を使用する処置から除外されることは考えられない。しかし、腫瘍細胞の型は、他の治療剤、特に化学療法剤および抗腫瘍細胞イムノトキシンを組合せた本発明の使用に関連し得る。本発明の治療の非結合体化および結合体化の局面は、腫瘍血管系増殖を阻害する抗脈管形成効果を含む。結合体化およびプロドラッグ処置局面は、さらに、腫瘍血管系を破壊するか、または閉鎖する。その血管系は実質的または全体的に全ての固形腫瘍で同じであるために、本発明の方法論は、腫瘍細胞自体の特定の表現型または遺伝子型に無関係に、全ての固形腫瘍の処置に広範に、または全体的に適用可能であることが理解される。

## 【0623】

VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体または免疫結合体構築物の治療的有效用量は、例えば、本明細書中に詳述される研究に示されるよ

うに、動物モデルからのデータを使用して容易に決定可能である。固形腫瘍を保持する実験動物は、臨床環境に移行する前に適切な治療用量を最適化するために、しばしば使用される。このようなモデルは、効果的な抗癌ストラテジーを予測する際に非常に信頼性があることが公知である。例えば、固形腫瘍を保持するマウス（例えば、本実施例で使用される）は、前臨床試験において広範に使用される。本発明者らは、このような分野で受容されるマウスモデルを使用して、最小の毒性で有益な抗腫瘍効果を与える治療剤の作用範囲を決定した。

#### 【0624】

非結合体化VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体を、抗脈管形成治療において使用する際に、当業者はまた、臨床処置のための用量の処方を補助するために、他の公開されたデータを使用し得る。例えば、本発明の抗体は、当該分野の抗体に対して、異なる利点を有するが、他の抗VEGF抗体を用いる処置に関する文献における情報は、なお、処置プロトコルおよび用量を設計または最適化するために、本出願のデータおよび教示と組み合わせて使用され得る。

#### 【0625】

例えば、Brostromら（1999）（具体的に、本明細書中で参考として援用される）は、MAb A4.6.1を使用して、インビボでの乳癌新脈管形成におけるVEGFの重要性を記載した。本発明の2C3様の抗体は、A4.6.1との比較研究において、等価なまたは改良された抗腫瘍応答を示したが、これらの抗体はまた、乳癌の処置において有意な有用性を有する。本発明者らは、当業者によって理解されるように、乳癌を有する患者が、代表的に、中年または老年の集団の女性であることをさらに認め、ここで、骨粗しょう症に関する関与もまた、明らかである。従って、本発明のVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体は、骨代謝に対する不利な効果を引き起こさないさらなる利点を有し、そして骨粗しょう症を有するか、またはその進行の危険性を有する乳癌患者における使用に対して好ましくはない。

#### 【0626】

同じ型の利点は、VEGFR2遮断抗VEGF抗体および2C3ベースの治療



剤を、小児癌の処置のための好ましい薬物にする。癌を有する子供において、健全なかつ実質的な骨成長を維持する必要性は、明らかである。VEGFR2遮断抗VEGF抗体（例えば、2C3）は、破骨細胞および軟骨吸収細胞の活性を実質的に損なわず、これらは、骨の成長において重要であるので、2C3は、他の抗体（例えば、A4.6.1）に比べて重要な利点を有する。

#### 【0627】

Brogstromら（1999）（具体的に、本明細書中で参考として援用される）は、MAb A4.6.1は、ドキソルビシンと組み合わせて使用される場合、有意な腫瘍後退を生じることを報告した。このことは、さらに、種々の癌を処置する際に、有意な臨床的な結果を達成するために、VEGFR2遮断抗VEGF抗体と従来の細胞毒性剤または化学治療剤とを組み合わせた使用を支持する。非結合体化ドキソルビシンおよびドキソルビシンプロドラッグ配合物の両方が、考慮される。

#### 【0628】

Ferraraおよび共同研究者らはまた、腫瘍保有マウスにおけるマウス抗VEGFモノクローナル抗体の効力および濃度-応答、ならびにヒト処置への推定について報告した（Mordentiら、1999、具体的に本明細書中で参考として援用される）。これらの研究は、マウス抗VEGFモノクローナル抗体の濃度-応答関係を評価するために設計され、その結果、抗体の組換えヒト化形態の有効血漿濃度が、癌患者において評価され得る。Mordentiら（1999）は、ヌードマウスにおける満足のいく腫瘍抑制が、マウス抗体の用量を使用して達成され、この用量は、必要とされる有効範囲におけるヒト用途に対して治療抗体を維持するのに有効な臨床的な投薬レジメンを規定するために、ヒト系に容易に適用され得ると結論した。従って、本発明の技術を受容するマウスモデルからのデータはまた、本明細書中に記載されるような、当業者に公知の技術に加えて、Mordentiら（1999）に報告された分析のタイプを使用して適切なヒト用量に変換され得る。

#### 【0629】

サルにおける組換えヒト化形態のGenentechの抗VEGF抗体（本明

細書中に特に参考として援用されるR y a nら、1999)の前臨床安全性評価の結果は、特定の候補治療剤に伴う欠点を例示するために役立つ。この抗体はこの動物において薬理学的活性を有するが、これらの研究においてサルは、過従属栄養軟骨細胞、肋軟骨下骨板形成、および成長板 (growth plate) の血管侵襲における用量関連増加により特徴付けられる骨端軟骨形成異常を示す。このような欠点は、V E G F R 2 遮断抗V E G F 抗体および2 C 3 ベースの治療剤の使用においては明らかでない。この使用は、V E G F R 1 により媒介される軟骨吸収細胞および軟骨細胞におけるV E G F 結合およびシグナル伝達を阻害しない。

#### 【0630】

G e n e t e c h のヒト化モノクローナル抗V E G F 抗体の前臨床的薬理学、種間比較 (interspecies scaling) および組織分布に対するさらなる研究によるデータは、L i n ら (1999, 本明細書中に参考として援用される) により報告された。これらの研究は、マウス、ラット、サル、およびウサギにおいて行われており、後者 (ウサギ) は、<sup>125</sup>I 標識抗体が使用されている。マウス、ラットおよびサルからの薬理学的データを、ヒトにおける相対成長的 (allometric) 比較を使用してヒト化対応抗体の薬物動態を推定するために使用した。従って、適切な投薬量情報を、ヒトの病理状態 (例えば、慢性関節リウマチ、眼の新生血管形成および癌) の処置のために開発し得る。

#### 【0631】

抗V E G F 抗体A 4. 6. 1 のヒト化バージョンを、抗癌剤のような臨床試験において使用した (B r e m, 1998; B a c a ら, 1997; P r e s t a ら, 1997; 各々が本明細書中に参考として援用される)。従って、このような臨床データもまた、本発明のV E G F R 2 遮断抗V E G F 抗体および2 C 3 処置の治療用量を設計する場合の参照供給源として考慮し得る。本発明は、腫瘍保有マウスの研究においてA 4. 6. 1 と同程度に2 C 3 が有効であることを示すが、V E G F がV E G F R 2 媒介作用のみを阻害することに対する特異性は利点である。W O 9 8 / 4 5 3 3 1 はまた、本明細書中に参考として援用されて、処

置において使用され得るヒト化抗VEGF抗体の用量を例示する。

#### 【0632】

腫瘍治療における結合体化VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの免疫結合体の使用に対して、当業者は、有益な効果を達成するために腫瘍血管系に広範な治療剤を送達するという成功に関する化学文献および特許文献を参照し得る。これらの文献としては、米国特許第5,855,866号；同第5,877,289号；同第5,965,132号；同第6,051,230号；同第6,004,555号；同第5,776,427号；同第6,004,554号；および同第6,036,955号；ならびに米国特許出願第08/482,369号（登録費は1998年10月20日に支払われた）の各々が挙げられ、これらは、このような治療薬剤—標的化薬剤構築物の使用をさらに記載する目的で、本明細書中に参考として援用される。

#### 【0633】

当該分野で公知のように、臨床処置に進める前に、前臨床試験と関係するガイドラインとして使用され得る、現実的目的が存在する。しかし、臨床への他のVEGF抗体の普及、本明細書中で示された受容されるモデルにおいてすでに実証された抗腫瘍効果、および現在のストラテジーの増強された安全性を鑑みて、本発明は、臨床的処置に対する最初の道を治療剤にもたらす。従って、前臨床試験は、最も有利な抗体、用量または組み合わせを選択するために利用され得る。

#### 【0634】

任意の一貫して検出可能な抗脈管形成効果、転移の阻害、腫瘍血管系破壊、腫瘍血栓症、壊死および／または一般的抗腫瘍効果を生じる、任意のVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体または免疫結合体の用量または組合せられた医薬は、有用な発明を規定する。本発明はまた、腫瘍の血管下流に対して効果的であり得る。すなわち、本発明は、排出（draining）血管の少なくともサブセットを標的化し、特に、腫瘍から放出されたサイトカインが、これらの血管に作用する場合に、これらの抗原性プロファイルを変化する。

#### 【0635】

VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体または免疫結合体

の用量または組み合わせ治療の抗脈管形成および／または腫瘍効果が、意図された治療範囲の下端に向かうような状況下でさえ、この治療が、特定の腫瘍標的または患者の状況における他の全ての公知の治療となお等価であるか、またはより効果的でさえあることがあり得ることもまた理解される。特定の腫瘍および状態が中期間または長期間効果的に処置され得ないことは臨床医に不幸にも明らかであるが、特に一般的に提案されている他のストラテジーと少なくともほぼ同様に効果的である場合、それは、本発明の治療の有用性を否定しない。

#### 【0636】

血管新生化腫瘍の処置のための、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体もしくは免疫結合体構築物または組み合わせの治療薬の適切な用量を設計する際に、当業者は、臨床投与のための適切な用量に到達するために、本明細書中に記載される動物研究および文献における技術的常識から容易に推定し得る。動物からヒトへの用量のコンバージョンを達成するために、当業者は、実験動物の単位質量あたり投与される薬剤の質量を計算し、そして好ましくは、実験動物とヒト患者との間の体表面積 ( $\text{m}^2$ ) の差異を計算する。全てのこのような計算は、当業者に周知でありそして慣用的である。

#### 【0637】

例えば、マウス研究において2C3の成功用量を採用して、そして質量および表面積に基づく標準的計算を適用すると、ヒト患者における使用に効果的な用量は、約  $1\text{ mg}/\text{m}^2$  ～約  $1000\text{ mg}/\text{m}^2$ 、好ましくは、約  $50\text{ mg}/\text{m}^2$  ～約  $500\text{ mg}/\text{m}^2$ 、そして最も好ましくは、約  $10\text{ mg}/\text{m}^2$  ～約  $100\text{ mg}/\text{m}^2$  である。これら用量は、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの裸の抗体およびVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの免疫結合体について適切であるが、この用量は、抗脈管形成剤として使用するための、裸のまたは非結合体化抗体に関連した使用に好ましい。

#### 【0638】

従って、この情報を使用して、本発明者らは、ヒト投与のための有用な低用量のVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベース抗体または免疫結合体は、約  $1\text{ mg}/\text{m}^2$ 、 $2\text{ mg}/\text{m}^2$ 、 $3\text{ mg}/\text{m}^2$ 、 $4\text{ mg}/\text{m}^2$ 、 $5\text{ mg}/\text{m}^2$ 、6

$\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $7\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $8\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $9\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $10\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $12\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $15\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $20\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $25\text{mg}/\text{m}^2$ 、約 $30\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $35\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $40\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $45\text{mg}/\text{m}^2$ または約 $50\text{mg}/\text{m}^2$ であり；そしてヒト投与のための有用な高用量のこのような抗体または免疫結合体は、約 $600\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $650\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $700\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $750\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $800\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $85\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $900\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $925\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $950\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $975\text{mg}/\text{m}^2$ または約 $1000\text{mg}/\text{m}^2$ である。ヒト投与のための有用な中程度の用量のVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベース抗体または免疫結合体は、約 $55\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $60\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $70\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $80\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $90\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $100\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $125\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $150\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $175\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $200\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $250\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $300\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $350\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $400\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $450\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $500\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $525\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $550\text{mg}/\text{m}^2$ または約 $575\text{mg}/\text{m}^2$ などの低用量と高用量との間の任意の用量であることが意図される。

### 【0639】

上記に引用されたいずれかの例示的用量を用いる任意の特定の範囲または特定の記載された範囲の間の任意の中間の値が意図される。VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの免疫結合体が使用される場合、凝固薬免疫複合体が一般的に毒素免疫結合体より高用量で使用され得ることがまた理解される。

### 【0640】

一般に、約 $10\sim100\text{mg}/\text{m}^2$ 、約 $10\sim90\text{mg}/\text{m}^2$ 、約 $10\sim80\text{mg}/\text{m}^2$ 、約 $20\sim100\text{mg}/\text{m}^2$ 、約 $20\sim90\text{mg}/\text{m}^2$ 、約 $20\sim80\text{mg}/\text{m}^2$ 、約 $30\sim100\text{mg}/\text{m}^2$ 、約 $30\sim90\text{mg}/\text{m}^2$ 、約 $30\sim80\text{mg}/\text{m}^2$ 、約 $15\sim100\text{mg}/\text{m}^2$ 、約 $25\sim100\text{mg}/\text{m}^2$ 、約 $35\sim100\text{mg}/\text{m}^2$ 、約 $15\sim90\text{mg}/\text{m}^2$ 、約 $25\sim90\text{mg}/\text{m}^2$ 、約 $35\sim90\text{mg}/\text{m}^2$ の間の投薬量範囲、あるいはVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体もしくは免疫結合体のそのような投薬量範囲が好ましい。これらの記載の範囲にかかわらず、本明細書中に提示されたパラメーターおよび詳細なガイダンスを考慮して、活性または最適な範囲でのさらなる変更は、本発明

の範囲内であることが理解される。

#### 【0641】

従って、他の薬剤と組合わせにおいて、低用量がより適切であり得、そして特に、VEGFR2にのみ結合するVEGFR2遮断抗VEGF抗体および2C3ベースの抗体の増強された安全性、ならびにVEGFR2遮断抗VEGF抗体および2C3ベースの抗凝固薬および抗脈管形成免疫結合体のなおさらに増強された安全性を考慮すると、高用量がなお許容され得ることは理解されるべきである。ヒトまたはヒト化抗体（および必要に応じて、ヒト抗凝固薬または抗脈管形成タンパク質）の使用は、健常組織における有意な毒性または副作用の機会をさらに減少して、本発明を臨床使用のためにさらに安全にする。

#### 【0642】

本発明の治療レジメの意図は、一般的に、受け入れられない毒性に関連するレベル未満の用量をなお維持しながら、有意な抗腫瘍効果を生成することである。用量自体の変化に加えて、投与レジメはまた、処置ストラテジーを最適化するために採用され得る。1つの処置プロトコルは、約 $1\text{ mg/m}^2 \sim 1000\text{ mg/m}^2$ 、好ましくは、約 $50\text{ mg/m}^2 \sim 500\text{ mg/m}^2$ 、そして最も好ましくは、約 $10\text{ mg/m}^2 \sim 100\text{ mg/m}^2$ のVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体もしくは免疫結合体、あるいはこれらを含む治療カクテル（therapeutic cocktail）を、1週間に1～3回、好ましくは、静脈内または筋肉内投与により、最も好ましくは、静脈内投与により投与することである。

#### 【0643】

特定の用量の投与において、当業者は、好ましくは薬学的受容可能な組成物（無菌性、発熱性、純度および一般的な安定性のFDA基準に従う）を患者に全身的に提供する。静脈内注射が、一般的に好ましい。約1時間または2時間などの期間にわたって連続注入を使用することもまた意図される。

#### 【0644】

当然、広範な使用の前に、臨床試験が実施される。臨床試験の実行の種々のエレメント（患者の処置およびモニタリングを含む）は、本発明の開示に照らして

当業者に公知である。以下の情報は、このような治験を確立する際の使用のための一般的なガイドラインとして提示されている。

【0645】

第1のVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの処置研究について選択される患者は、従来の治療の少なくとも1つの過程に応答せず、そして身体検査、実験技術、および／またはX線撮影手段によって決定されるような客観的に測定可能な疾患を有する。いずれの化学療法も、本研究に入る少なくとも2週間前に停止する。マウスモノクローナル抗体または抗体部分を使用する場合、患者はマウス免疫グロブリンに対するアレルギーの病歴を有さない。

【0646】

特定の利点は、三管腔ポート (triple lumen port) を有する中心静脈カテーテルの留置を使用する際に見出される。VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの薬剤は、例えば、0.22  $\mu$  フィルターを使用して濾過され、そして適切に (例えば、生理食塩水で) 100 ml の最終用量に希釈される。使用の前に、この試験サンプルはまた、同様の様式で濾過され、そしてA<sub>280</sub> を測定することによって濾過の前後でその濃度を評価される。予想される回収率は、87%～99%の範囲内であり、次いで、タンパク質の損失についての調整が補正される。

【0647】

VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体もしくは結合体は、約4～24時間の期間にわたって投与され、各患者は、2～7日間の間隔で2～4回の注入を受ける。投与はまた、7日間にわたって一定速度の注入によって実施され得る。任意の用量レベルで与えられる注入は、観察される任意の毒性に依存する。従って、グレードIIの毒性が、任意の単回注入後または一定速度注入の間の特定の期間で達した場合、毒性が改善されない限り、さらなる用量を中止するか、またはその一定速度注入を停止する。漸増用量のVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの治療剤は、約60%の患者が、任意のカテゴリにおいて、受け入れられないグレードIIIまたはIVの毒性を示すまで、患者群に投与される。この値の2/3である用量が、安全用量として定義される

。

## 【0648】

身体検査、腫瘍測定、および実験室試験は、もちろん、処置前および1ヶ月後までの間隔で実施される。実験室試験としては、全血球計数、血清クレアチニン、クレアチニンキナーゼ、電解質、尿素、SGOT、窒素、ビリルビン、アルブミン、および全血清タンパク質が挙げられる。処置後60日までに採取された血清サンプルは、投与された治療剤、およびそのいずれかの部分に対する抗体の存在について放射免疫アッセイによって評価される。任意の標準的アッセイ（例えば、ELISAまたはRIAのような）を使用する、血清の免疫学的分析は、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの治療剤の薬物動態およびクリアランスの評価を可能にする。

## 【0649】

抗腫瘍応答を評価するために、患者を、最後の注入の、48時間後～1週間後に、そして再び30日後に試験するべきである。触知可能な疾患が存在した場合、全ての塊の二つの垂直直径（perpendicular diameter）を、処置の間毎日、治療完了後1週間以内、および30日で測定すべきである。触知可能でない疾患を測定するために、連続CTスキャンが、胸部、腹部、および骨盤の全体を通して、1cm間隔で、48時間～1週間で、そして30日で再び実施され得る。組織サンプルはまた、組織学的におよび／あるいはフローサイトメトリーにより、疾患部位から、または適切であれば血液もしくは体液サンプルからの生検を用いて評価されるべきである。

## 【0650】

臨床応答は、受容可能な基準により規定され得る。例えば、完全な応答は、処置の1カ月後、全ての測定可能な腫瘍がみられないことにより規定され得る。これに対し、部分的な応答は、処置の1カ月後に、増大を示す腫瘍部位なしでの、全ての評価可能な腫瘍小節の垂直直径の積の和の50%またはそれ以上の減少により規定され得る。同様に、混合応答は、処置の1カ月後に、一つ以上の部位での進行を伴った、全ての測定可能な病巣の垂直直径の積の50%以上の減少により規定され得る。



**【0651】**

上記のような臨床試験の結果を鑑みて、さらにより正確な処置レジメが処方され得る。そうであったとしても、投与量におけるいくつかのバリエーションは、処置される被験体の状態に依存して、後で必要であり得る。投与に責任をもつ医者は、本開示に鑑みて、個々の被験体に適切な用量を決定し得る。このような最適化および調節は、当該分野において慣用的に実施され、そして過剰な実験量をけっして反映しない。

**【0652】****(G. 組合わせ治療)**

脈管形成疾患（例えば、関節炎、乾癬、アテローム硬化症、糖尿病性網膜症、加齢性黄斑変性、グレーブス病、血管再狭窄、血管腫および血管新生緑内障（あまたは上記の他の疾患））または固形腫瘍を処置するために使用される場合、本発明は、他の治療と組合わされ得る。

**【0653】**

本発明のVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの処置方法は、患者が示す特定の腫瘍、疾患または障害の処置において、一般的に使用される他の任意の方法と組み合わせられ得る。特定の治療的アプローチが、患者の状態に、それ自体で有害であることが公知でなく、そしてVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの処置を有意に相殺しない限り、本発明とのその組み合わせが意図される。

**【0654】**

固形腫瘍処置と関連して、本発明は、古典的なアプローチ（例えば、手術、放射線治療、化学療法など）との組み合わせにおいて使用され得る。それゆえ、本発明は、組み合わせ治療を提供し、そこでは、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの構築物が、手術、または放射線処置と、同時に、その前に、またはその後使用される；または従来の化学療法剤、放射線療法剤、または抗血管形成剤、あるいは標的化イムノトキシンまたはコアグリガンドとともに、その前に、またはその後、患者に投与される。

**【0655】**

本発明と放射線療法、放射線療法薬剤、抗脈管形成薬剤、アポトーシス誘導薬剤および抗チューブリン薬物とを組合わせた使用は、特に好ましい。このような薬剤の多くの例は、本発明の免疫結合体とともに、上記で記載される。治療結合体の一部として使用するために最初に記載された任意の薬剤はまた、別々に使用され得るが、本発明と実施可能に組合わけても使用され得る。

#### 【0656】

1つ以上の薬剤がVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの治療との組み合わせにおいて使用される場合、組み合わせられた結果が、各処置が別々に実施されるときに観察される効果の相加である必要性はない。少なくとも相加的效果が、一般的に、望ましいが、単一の治療の1つを超える増加した抗腫瘍効果が有益である。また、組み合わせ処置が相乗効果を示す特定の要件は存在しないが、これは、もちろん可能であり、かつ有利である。

#### 【0657】

組み合わせられた抗腫瘍治療を実施するために、動物内でそれらの組み合わせられた抗腫瘍作用を生じるに効果的な様式で別の抗癌剤と組み合わせ、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの構築物を動物に単に投与する。従って、その薬剤は、腫瘍血管系内にそれらを組み合わせ存在させ、かつ腫瘍環境においてそれらの組み合わせられた作用が生じるに、有効な量および有効な時間で提供される。この目的を達成するために、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの治療剤および抗癌剤が、同時に、単一の組成物または異なる投与経路を用いる2つの異なる組成物のいずれかにおいて、動物に投与され得る。

#### 【0658】

あるいは、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの処置は、抗癌剤処置の前に、または続いて、例えば、数分から数週間および数ヶ月にわたる間隔でなされ得る。当業者は、抗癌剤およびVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの薬剤は、腫瘍に対して有利な組み合わせ効果を発揮することを確認する。

#### 【0659】

大部分の抗癌剤は、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの抗脈管形成治療の前に与えられ得る。しかし、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの免疫結合体を使用される場合、種々の抗癌剤が同時に、または続いて投与され得る。

#### 【0660】

癌の処置における物質の組み合わせの一般的な使用は、周知である。例えば、米国特許第5、710、134号（本明細書中に参考として援用される）は、非毒性物質または「プロドラッグ」との組み合わせにおいて腫瘍において壊死を誘導する成分を開示する。壊死プロセスにより放出された酵素は、非毒性の「プロドラッグ」を切断して、毒性の「薬物」にし、これは、腫瘍細胞死を導く。また、米国特許第5、747、469号（本明細書中に参考として援用される）は、p53およびDNA損傷因子（DNA damaging agent）をコードするウイルスベクターの組み合わせられた使用を開示する。任意のこのような類似のアプローチが、本発明とともに使用され得る。

#### 【0661】

いくつかの状況において、有意に処置期間を延長（それぞれの投与間に数日（2、3、4、5、6または7）、数週間（1、2、3、4、5、6、7または8）あるいはさらに数ヶ月（1、2、3、4、5、6、7または8）の経過）することは、望ましくさえあり得る。これは、1つの処置が、実質的に腫瘍を破壊することを意図し（例えば、手術及び化学療法）、そして別の処置が、微小転移巣または腫瘍の再増殖を予防することを意図する（例えば、抗脈管形成ベースの治療）状況において、有利である。抗脈管形成剤は、手術後に慎重に投与されて、効率的な創傷治癒を可能にすべきである。

#### 【0662】

VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの薬剤または抗癌剤のいずれかの一つを超える投与が利用されることがまた、想定される。これらの薬剤は、1日おきまたは1週間おきに、交換可能に投与され得る；または一連のVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの処置が行われ、次いで、一連の抗癌剤治療が行なわれ得る。いずれにせよ、組み合わせ治療を用いて腫瘍の後

退を達成するために、必要とされる全ては、投与時間にかかわらず、抗腫瘍効果を発揮するに有効な組み合わせられた量で両方の薬剤を送達することである。

### 【0663】

手術に関して、任意の外科的介入が、本発明との組み合わせにおいて実施され得る。放射線療法と関連して、腫瘍細胞内で局所的にDNA損傷を誘導する任意の機構（例えば、 $\gamma$ 照射、X線、UV照射、マイクロ波、およびさらに電子発光（electronic emission）など）が意図される。腫瘍細胞への指向されたラジオアイソトープの送達が可能とされ、そしてこれは、標的化抗体または他の標的化手段、および好ましくは、VEGFR2遮断抗VEGF抗体（例えば、2C3）との関連において使用され得る。

### 【0664】

サイトカイン治療はまた、組み合わせられた治療レジメの有効なパートナーであることが実証された。種々のサイトカインは、そのような組み合わせアプローチにおいて使用され得る。サイトカインの例には、以下が挙げられる：IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、TGF- $\beta$ 、GM-CSF、M-CSF、G-CSF、TNF $\alpha$ 、TNF $\beta$ 、LAF、TCGF、BCGF、TRF、BAF、BDG、MP、LIF、OSM、TMF、PDGF、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 。サイトカインは、臨床的な指標（例えば、患者の状態、およびサイトカインの相対的な毒性）と一致する標準的なレジメに従って投与される。ウテログロビン（uteroglobin）をまた使用して、転移を予防または阻害し得る（米国特許第5,696,092号；本明細書中に参考として援用される）。

### 【0665】

#### （G1. 化学療法剤）

特定の実施形態において、本発明のVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの治療薬剤は、化学療法剤と組み合わせ投与され得る。種々の化学療法剤は、本明細書中に開示される組み合わせ処置方法において使用され得る。例示として意図される化学療法剤としては、以下が挙げられる：例えば、アドリア

マイシン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、カルミノマイシン、ダウノマイシン、ドキソルビシン、タモキシフェン、タキソール、タキソテール、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン (vinorelbine)、エトポシド (VP-16)、5-フルオロウラシル (5FU)、シトシンアラビノシド、シクロホスファミド、チオテパ、メトトレキセート、カンプトセシン、アクチノマイシン-D、マイトマイシンC、シスプラチン (CDDP)、アミノプテリン、コンブレタスタチン (conbrexastatin)、ならびにそれらの誘導体およびプロドラッグ。

#### 【0666】

当業者に理解されるように、適切な用量の化学療法剤は、一般に、臨床治療においてすでに利用されてきており、ここで、この化学療法剤は、単独で、または他の化学療法剤と組み合わせて投与される。例示のみのために、シスプラチンのような薬剤、および他のDNAアルキル化剤が使用され得る。シスプラチンは、癌を処置するために広範に使用され得、臨床適用において使用される有効な用量は、総計3つの経路について3週間毎に5日間  $20 \text{ mg/m}^2$  である。シスプラチンは、経口で吸収されず、従って、注射を介して、静脈内で、皮下で、腫瘍内で、または腹腔内で送達されねばならない。

#### 【0667】

さらに有用な薬剤は、DNA複製、有糸分裂、および染色体分離に干渉する化合物を含む。このような化学療法剤化合物には、アドリアマイシン（ドキソルビシンとしてもまた公知である）、エトポシド、ベラパミル、ポドフィロトキシンなどが挙げられる。新形成の処置のための臨床設定において広範に使用されるので、これらの化合物は、静脈内では、アドリアマイシンについて21日間隔で  $25 \sim 75 \text{ mg/m}^2$  からエトポシドについては  $35 \sim 50 \text{ mg/m}^2$  までの範囲の用量で、静脈内にボラス注射を通じて、または経口的に静脈内用量の2倍で、投与される。

#### 【0668】

ポリヌクレオチド前駆体の合成および忠実度を崩壊させる薬剤もまた使用され得る。特に有用なものは、広範な試験を受け、そして容易に利用可能な薬剤であ

る。そのようなものとして、5-フルオロウラシル（5-FU）のような薬剤は、新形成組織によって優先的に使用され、新形成細胞に対する標的化のためにこの薬剤を特に有用にさせる。非常に毒性の5-FUは、広範囲のキャリア（局所を含む）において適用可能であるが、3～15mg/kg/日の範囲の用量を有する静脈内投与が一般に使用される。

【0669】

組合せ治療に関する例示的な化学療法剤は、表Cにおいて列挙される。そこで列挙される各薬剤は、例示的であり、そして限定することを意味しない。当業者は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15版、第33章（特に624頁～652頁）に指向される。投薬量における改変は、おそらく、処置されるべき被験体の状態に依存して生じる。処置を施す医師は、個々の被験体について適切な用量を決定し得る。

【0670】

【表4】

表C

## 新形成疾患において有用な化学療法剤

クラス	薬剤の型	非商品名 (他の名称)	疾患
アルキル化剤	ナイトロジェンマスタード	メクロレタミン (HN <sub>2</sub> )	ホジキン病、非ホジキンリンパ腫
		シクロホスファミド イフォスファミド (ifosfamide)	急性および慢性リンパ球性白血病、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、乳房、卵巣、肺、ウィルムス腫、頸、精巣、軟組織肉腫
		メルファラン (L-サルコリン)	多発性骨髄腫、乳房、卵巣
		クロラムブシル	慢性リンパ球性白血病、原発性マクログロブリン血症、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫
	エチレンイミンおよびメチルメラミン	ヘキサメチルメラミン	卵巣
		チオテバ	膀胱、乳房、卵巣
	アルキルスルホネート	ブスルファン	慢性顆粒球性白血病
	ニトロソ尿素類	カルムスチン (BCNU)	ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、原発性脳腫瘍、多発性骨髄腫、悪性骨髄腫
		ロムスチン (CCNU)	ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、原発性脳腫瘍、小細胞肺
		セムスチン (メチル-CCNU)	原発性脳腫瘍、胃、結腸
		ストレプトゾシン (ストレプトゾチン (Streptozotocin))	悪性膵臓インスリノーマ、悪性カルチノイド
	トリアジン	ダカルバジン (DTIC; ジメチルトリアゼノイミダゾールカルボキサミド)	悪性黒色腫、ホジキン病、軟組織肉腫
代謝拮抗物質	葉酸アナログ	メトトレキサート (アメトプテリン)	急性リンパ球性白血病、絨毛癌、菌状息肉腫、乳房、頭および頸、肺、骨原性肉腫
	ピリミジンアナログ	フルオウラシル (5-フルオロウラシル; 5-FU) フロクスウリジン (フルオリド-オキシウリジン; FUDR)	乳房、結腸、胃、膵臓、卵巣、頭頸部、膀胱、前悪性皮膚病変 (局所的)
		シタラビン (シトシンアラビノシド)	急性顆粒球性白血病および急性リンパ球性白血病
	プリンアナログおよび関連するインヒター	メルカプトプリン (6-メルカプトプリン; 6-MP)	急性リンパ球性白血病、急性顆粒球性白血病および慢性顆粒球性白血病
		チオグアニン (6-チオグアニン; TG) ベントスタチン (2-デオキシコホルマイシン)	急性顆粒球性白血病、急性リンパ球性白血病および慢性顆粒球性白血病 毛細胞白血病、菌状息肉腫、慢性リンパ球性白血病

(表C 続)

天然産物	ビンカアルカロイド類	ビンブラスチン(VL8)	ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、乳房、精巣
		ビンクリスチン	急性リンパ球性白血病、神経芽細胞腫、ウィルムス腫、横紋筋肉腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、小細胞肺
	エピソード イロトキシ ン(Epipodop hyllotoxin)	エトポシド ターチポシド(Tertiposide)	精巣、小細胞肺および他の肺、乳房、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、急性顆粒球性白血病、カポージ肉腫
	抗生物質	ダクチノマイシン(アクチノマイシンD)	絨毛癌、ウィルムス腫、横紋筋肉腫、精巣、カポージ肉腫
		ダウノルビシン(ダウノマイシン; ルビドマイシン)	急性顆粒球性白血病および急性リンパ球性白血病
		ドキソルビシン	軟組織、骨原性肉腫および他の肉腫; ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、急性白血病、乳房、尿生殖器、甲状腺、肺、胃、神経芽細胞腫
		ブレオマイシン	精巣、頭頸部、皮膚、食道、肺および尿生殖器管; ホジキン病、非ホジキンリンパ腫
		プリカマイシン(Plicamycin)(ミトラマイシン)	精巣、悪性高カルシウム血症
		マイトマイシン(マイトマイシンC)	胃、頸、結腸、乳房、脾臓、膀胱、頭頸部
	酵素	L-アスバラギナーゼ	急性リンパ球性白血病
	生物学的応答改質剤	インターフェロン $\alpha$	毛細胞白血病、カポージ肉腫、黒色腫、カルチノイド、腎細胞、卵巣、膀胱、非ホジキンリンパ腫、菌状息肉腫、多発性骨髄腫、慢性顆粒球性白血病
種々の薬剤	白金配位錯体	シスプラチン(cis-DDP) カルボプラチン	精巣、卵巣、膀胱、頭頸部、肺、甲状腺、頸、子宮内膜、神経芽細胞腫、骨原性肉腫
	アントラセンジオン	ミトザントロン	急性顆粒球性白血病、乳房
	置換型尿素	ヒドロキシ尿素	慢性顆粒球性白血病、真性赤血球増加症、本能的(essential)血小板増加症、悪性黒色腫
	メチルヒドラジン誘導体	プロカルバジン(N-メチルヒドラジン, M1H)	ホジキン病
	副腎皮質抑制	ミトーテン(o,p'-DDD)	副腎皮質
		アミノグルテチミド	乳房



(表2の続き)

ホル モン およ び アン タ ゴ ニ スト	アドレノコ ルチコステ ロイド	プレドニゾン（利用可能ない くつかの他の等価調製物）	急性および慢性リンパ球性白血病、 非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、 乳房
	プロゲステ ン	カブロン酸ヒドロキシプロゲ ステロン 酢酸メドロキシプロゲステロ ン 酢酸メゲストロール	子宮内膜、乳房
	エストロゲ ン	ジエチルスチルベストロール エチニルエストラジオール （利用可能な他の調製物）	乳房、前立腺
	抗エストロ ゲン	タモキシフェン	乳房
	アンドロゲ ン	プロピオン酸テストステロン フルオキシメステロン（利用 可能な他の調製物）	乳房
	抗アンドロ ゲン	フルタミド	前立腺
	性腺刺激ホ ルモン放出 ホルモンア ナログ	ロイプロリド	前立腺

## (G 2. 抗新脈管形成)

正常な生理学的条件下では、ヒトまたは動物は、非常に特異的な制限された状況においてのみ抗新脈管形成を受ける。例えば、新脈管形成は、通常、創傷治療、胎児および胚発生、ならびに黄体、子宮内膜および胎盤の形成において観察される。制御されていない（持続性のおよび／または調節されていない）新脈管形成は、種々の疾患状態に関連し、ならびに腫瘍転移の間に生じる。

## 【0671】

制御された新脈管形成および制御されていない新脈管形成はともに、類似の様式において進行すると考えられている。内皮細胞および周皮細胞（基底膜によって囲まれる）は、毛細血管を形成する。新脈管形成は、内皮細胞および白血球により放出される酵素によって基底膜の侵食で開始する。次いで、内皮細胞（これは、血管の内腔に沿う）は、基底膜を通して突出する。新脈管形成刺激因子は、内皮細胞を、腐食された基底膜を通じて遊走するように誘導する。遊走する細胞は、親血管から「新芽」を形成し、ここで、この内皮細胞は有糸分裂を受け、そして増殖する。内皮新芽は、互いに合わせられて、新たな血管を作製する毛細血

管わなを形成する。

### 【0672】

VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3に基づく本発明は、任意の1つ以上の抗脈管形成治療と組み合わせて使用され得る。VEGFを阻害する他の因子との組み合わせもまた含まれ、他の因子としては、例えば、他の中和抗体（Kimら、1992；Prestaら、1997；Sioussatra、1993；Kondoら、1993；Asanoら、1995）、可溶性レセプター構築物（KendallおよびThomas、1993；Aielloら、1995；Linら、1998；Millaunerら、1996）、チロシンキナーゼインヒビター（Siemeisterら、1998）、アンチセンスストラテジー、RNAアプタマーおよびVEGFに対するリボザイムまたはVEGFレセプター（Salehら、1996；Chengら、1996；Keら、1998；Parryら、1999；各々は、参考として本明細書中で援用される）が挙げられる。アンタゴニスト特性を有するVEGFの改変体もまた、WO98/16551（具体的に参考として本明細書中で援用される）に記載されるように、使用され得る。

### 【0673】

抗脈管形成治療は、抗脈管形成因子の供給または脈管形成因子の阻害に基づき得る。脈管形成因子の阻害は、VEGFを阻害について記載される1以上の方法により達成され得る。ここで、中和抗体、可溶性レセプター構築物、小分子インヒビター、アンチセンス、RNAアプタマーおよびリボザイムを含む方法が全て使用され得る。例えば、脈管形成に対する抗体は、米国特許第5,520,914号（具体的に、参考として本明細書中で援用される）に記載されるように使用され得る。FGFが新脈管形成と関連する場合、FGFインヒビターもまた使用され得る。ある例は、グリコサミノグリカン（例えば、アルカラン硫酸（archaran sulfate）を含む、それらの反復単位として2-O-硫化ウロン酸で配列において変更しているN-アセチルグルコサミンを有する化合物である。このような化合物は、米国特許第6,028,061号（具体的に、参考として本明細書中で援用される）に記載され、そして本明細書と共に使用され得る。

る。

#### 【0674】

種々の疾患状態で顕著であるように、新脈管形成の処置に有用である多数のチロシンキナーゼインヒビターが、現在公知である。これらとしては、例えば、米国特許第5,639,757号（具体的に、参考として本明細書中で援用される）の4-アミノピロール[2,3-d]ピリミジンが挙げられる。これはまた、本発明と組み合わせて使用され得る。VEGDR2レセプターを介するチロシンキナーゼシグナル伝達を媒介し得る有機分子のさらなる例は、キナゾリン化合物および米国特許第5,792,771号（具体的に、脈管形成疾患の処置における本発明と共に使用するためのさらなる組み合わせを記載する目的で、参考として本明細書中で援用される）の組成物である。

#### 【0675】

他の化学クラスの化合物はまた、新脈管形成を阻害することが示されており、そして本発明と組み合わせて使用され得る。例えば、米国特許第5,972,922号（具体的に、参考として本明細書中で援用される）に記載されるステロイド（例えば、新脈管形成の4,9(11)-ステロイドおよびC21-酸化ステロイド）は、併用治療において使用され得る。米国特許第5,712,291号および同第5,593,990号（各々、参考として本明細書中で援用される）は、サリドマイドならびに関連する化合物、前駆体、アナログ、代謝物および加水分解産物を記載する。これらもまた、新脈管形成を阻害するために本発明と組み合わせて使用され得る。米国特許第5,712,291号および同第5,593,990号における化合物は、経口的に投与され得る。組合せ治療に関して有用である、さらなる例示的な抗新脈管形成剤は、表Dに列挙される。ここで列挙される各薬剤は、例示であって、限定することを意味しない。

#### 【0676】

#### 【表5】

## 表 D

新脈管形成のインヒビターおよびネガティブ調節剤

物質	参考文献
3-アングリオテン	O'Reilly <i>et al.</i> , 1994
エンドスタチン	O'Reilly <i>et al.</i> , 1997
16kDa 7-アングリオテン 737メント	Ferrara <i>et al.</i> , 1991; Clapp <i>et al.</i> , 1993; D'Angelo <i>et al.</i> , 1995; Lee <i>et al.</i> , 1998
ラミニン 1-74ド	Kleinman <i>et al.</i> , 1993; Yamamura <i>et al.</i> , 1993; Iwamoto <i>et al.</i> , 1996; Tryggvason, 1993
717-アングリオテン 74ド	Grant <i>et al.</i> , 1998; Sheu <i>et al.</i> , 1997
組織メタロプロテイナーゼインヒビター (TIMP 1, 2, 3, 4)	Sang, 1998
7-アスミ-ゲン 74ド 1-74ド (PAI-1, -2)	Soff <i>et al.</i> , 1995
腸癌環境因子 (高用量, インビトロ)	Frater-Schroder <i>et al.</i> , 1987
TGF-β1	RayChadhury and D'Amore, 1991; Tada <i>et al.</i> , 1994
1-7-720 (IFN-α, -β, γ)	Moore <i>et al.</i> , 1998; Lingen <i>et al.</i> , 1998
ELR-CXC ケモカイン : IL-12; SDF-1; MIG; 血小板因子 4 (PF-4); IP-10	Moore <i>et al.</i> , 1998; Hiscox and Jiang, 1997; Coughlin <i>et al.</i> , 1998; Tanaka <i>et al.</i> , 1997
トロンボスポンジン (TSP)	Good <i>et al.</i> , 1990; Frazier, 1991; Bornstein, 1992; Tolsma <i>et al.</i> , 1993; Sheibani and Frazier, 1995; Volpert <i>et al.</i> , 1998
SPARC	Hasselaar and Sage, 1992; Lane <i>et al.</i> , 1992; Jendraschak and Sage, 1996
2-メチルエストラジオール	Fotsis <i>et al.</i> , 1994
7-アングリオテン (proliferin) 関連タンパク質	Jackson <i>et al.</i> , 1994
スラミン	Gagliardi <i>et al.</i> , 1992; Takano <i>et al.</i> , 1994; Waltenberger <i>et al.</i> , 1996; Gagliardi <i>et al.</i> , 1998; Manetti <i>et al.</i> , 1998
サリドマイド	D'Amato <i>et al.</i> , 1994; Kenyon <i>et al.</i> , 1997 Wells, 1998

(表Dの続き)

コルチゾン	Thorpe <i>et al.</i> , 1993 Folkman <i>et al.</i> , 1983 Sakamoto <i>et al.</i> , 1986
リナミド	Vukanovic <i>et al.</i> , 1993; Ziche <i>et al.</i> , 1998; Nagler <i>et al.</i> , 1998
アマガリン (AGM-1470; TNP-470)	Sipos <i>et al.</i> , 1994; Yoshida <i>et al.</i> , 1998
タモキシフェン	Gagliardi and Collins, 1993; Linder and Borden, 1997; Haran <i>et al.</i> , 1994
朝鮮ヤドリギ抽出物 ( <i>Viscum album coloratum</i> )	Yoon <i>et al.</i> , 1995
レタミド	Oikawa <i>et al.</i> , 1989; Lingen <i>et al.</i> , 1996; Majewski <i>et al.</i> 1996
CM101	Hellerqvist <i>et al.</i> , 1993; Quinn <i>et al.</i> , 1995; Wamil <i>et al.</i> , 1997; DeVore <i>et al.</i> , 1997
デキサメタゾン	Hori <i>et al.</i> , 1996; Wolff <i>et al.</i> , 1997
白血病阻害因子 (LIF)	Pepper <i>et al.</i> , 1995

新脈管形成の阻害における使用のための特定の好ましい化合物は、アンギオスタチン (angio statin)、エンドステイン、バスキュロスタチン (vasculostat in)、カンスタチン (can stat in) およびマスピン (mas pin) である。このような薬剤は、本発明の免疫結合体と組み合わせて上記される。しかし、これらは、組み合わせて使用され得るが、接合体形成する。接合体形態で上記される他の好ましい薬剤はまた、アンギオポイエチン (angio poiest in) (具体的に、アンギオポイエチン-2) であり、これは、本発明との組み合わせ使用のために意図される。

#### 【0677】

特定の抗脈管形成治療は、腫瘍の後退を引き起こすことが既に示されており、細菌性多糖 CM101 および抗体 LM609 が含まれる。CM101 は、細菌性ポリサッカリドであり、これは、腫瘍において新血管炎症を誘導する能力において十分に特徴付けられている。CM101 は、補体系の活性化を刺激する脱分化した内皮上で発現されるレセプターに結合し、そして架橋する。それはまた、腫瘍を選択的に標的するサイトカイン駆動化炎症応答を開始する。これは、発現 VEGF およびそのレセプターをダウンレギュレートする固有の抗病理新脈管形

成剤である。CM101は、現在、抗癌剤として臨床試験中であり、そしてこれと組み合わせて使用され得る。

#### 【0678】

トロンボスポンジン (thrombospondin) (TSP-1) および血小板因子4 (PF4) もまた、本発明と合わせて使用され得る。これらはともに、ヘパリンと会合する新脈管形成インヒビターであり、そしてまた血小板 $\alpha$ -顆粒において見出される。TSP-1は、細胞外マトリクスの構成成分である、大きな450kDaのマルチドメイン糖タンパク質である。TSP-1は、HSPG、フィブロネクチン、ラミニン、および種々の型のコラーゲンを含む、細胞外マトリクスにおいて見出される多くのプロテオグリカン分子に結合する。TSP-1は、インビトロにおいて内皮細胞遊走および増殖、ならびにインビボにおいて新脈管形成を阻害する。TSP-1はまた、形質転換された内皮細胞の悪性表現型および腫瘍形成を抑制し得る。腫瘍抑制遺伝子p53は、TSP-1の発現を直接的に調節することが示されており、その結果、p53活性の損失は、TSP-1生成における劇的な減少、および腫瘍が開始する新脈管形成を付随する増大を生じる。

#### 【0679】

PF4は、ケモカインのCXCL12ファミリーのメンバーである70kDaタンパク質あり、これは、インビトロにおける内皮細胞の増殖およびインビボにおける新脈管形成を強力に阻害し得る。腫瘍内に投与された、またはアデノウイルスベクターによって送達されたPF4は、腫瘍増殖の阻害を生じ得る。

#### 【0680】

インターフェロンおよびメタロプロテイナーゼインヒビターは、本発明と併用され得る、2つの他のクラスの天然に存在する脈管形成インヒビターである。インターフェロンの抗内皮活性は、1980年代初期から公知であるが、阻害の機構は、未だ明確でない。これらが内皮細胞の移動を阻害し得ること、およびこれらが、腫瘍細胞による新脈管形成プロモーターの産生を阻害する能力によっておそれく媒介される、インビボでのいくつかの抗新脈管形成活性を有することは公知である。血管腫瘍は具体的に、インターフェロンに感受性であり、例えば、増

殖中の血管腫は I F N  $\alpha$  で首尾よく処置され得る。

#### 【0681】

メタロプロテイナーゼの組織インヒビター (T I M P) は、天然に存在するマトリックスメタロプロテアーゼ (M M P) のインヒビターのファミリーであり、これもまた、新脈管形成を阻害し得、そして併用処置プロトコルにおいて使用され得る。M M P は、新脈管形成プロセスにおいて重要な役割を果たす。なぜなら、これらは、血管網を拡大または再構築する場合、内皮細胞および線維芽細胞が移動するマトリックスを分解するからである。実際、M M P の1つのメンバーであるM M P - 2 は、おそらくこの目的のためにインテグリン  $\alpha v \beta 3$  を介して活性化された内皮と会合することが示されている。この相互作用がM M P - 2 のフラグメントによって崩壊される場合、次いで新脈管形成はダウンレギュレートされ、そして腫瘍増殖において阻害される。

#### 【0682】

新脈管形成を阻害する多くの薬理学的物質が存在し、これらの任意の1以上が本発明と組合せて使用され得る。これらの物質としては、A G M - 1 4 7 0 / T N P - 4 7 0、サリドマイド、およびカルボキシアミドトリアゾール (C A I) が挙げられる。フマギリンは、1990年に新脈管形成の強力なインヒビターであることが見出されており、そしてそれ以来、フマギリンの合成アナログである、A G M - 1 4 7 0 およびT N P - 4 7 0 が開発されてきた。これら両方の薬物は、インビトロでの内皮細胞増殖およびインビボでの新脈管形成を阻害する。T N P - 4 7 0 は、ヒトの臨床試験で広範に研究され、そのデータは長期の投与が最適であることを示唆する。

#### 【0683】

サリドマイドは、元来鎮静薬として使用されていたが、強力な催奇形物質であることが見出され、そして中止された。1994年に、サリドマイドは新脈管形成インヒビターであることが見出された。サリドマイドは現在、抗癌剤および血管性の眼疾患の処置として臨床試験されている。

#### 【0684】

C A I は新脈管形成の低分子量の合成インヒビターであり、これは、アクチン

の再組織化、内皮細胞の移動およびコラーゲン I V 上での延展を妨げる、カルシウムチャネルブロッカーとして作用する。CAI は生理学的に達成可能な濃度で新生血管形成を阻害し、そして癌患者によって経口的に十分許容される。CAI を用いた臨床試験によって、処置前に進行性の疾患を有する癌患者の 49 % において疾患の安定化を生じた。

#### 【0685】

ヘパリンまたはヘパリンフラグメントの存在下のコルチゾンは、内皮細胞増殖をブロックすることによってマウスにおいて腫瘍増殖を阻害することが示された。ステロイドおよびヘパリンの相加的な阻害効果に關与する機構は明らかでないが、ヘパリンが内皮細胞によるステロイドの取り込みを増加させ得ると考えられる。この混合物は、新しく形成された毛細血管の下基底膜の溶解を増加させることが示されており、そしてこれはまた、相加的な血管抑制 (a n g i o s t a t i c) 効果についての可能性のある説明である。ヘパリン-コルチゾール結合体はまた、インビボでの強力な血管抑制効果活性および抗腫瘍効果活性を有する。

#### 【0686】

さらに特定の新脈管形成インヒビター (抗侵襲性因子 (A n t i - I n v a s i v e F a c t o r) 、レチノイン酸およびパクリタキセル (米国特許第 5, 716, 981 号; 参考として本明細書中に援用される) ; A G M - 1470 (I n g b e r ら、1990; 参考として本明細書中に援用される) ; サメ軟骨抽出物 (米国特許第 5, 618, 925 号; 参考として本明細書中に援用される) ; アニオン性ポリアミドオリゴマーまたはアニオン性ポリ尿素オリゴマー (米国特許第 5, 593, 664 号; 参考として本明細書中に援用される) ; オキシンドール (o x i n d o l e) 誘導体 (米国特許第 5, 576, 330 号; 参考として本明細書中に援用される) ) ; エストラジオール誘導体 (米国特許第 5, 504, 074 号; 参考として本明細書中に援用される) ; およびチアゾールピリミジン誘導体 (米国特許第 5, 599, 813 号; 参考として本明細書中に援用される) を含むが、これらに限定されない) はまた、本発明の併用使用のための、抗新脈管形成組成物としての使用が意図される。



## 【0687】

$\alpha_v \beta_3$  インテグリンのアンタゴニストを含む組成物はまた、本発明と組合せて新脈管形成を阻害するために使用され得る。米国特許第5,766,591号（参考として本明細書中に援用される）に開示されるように、RGD含有ポリペプチドおよびその塩（環状ポリペプチドを含む）は、 $\alpha_v \beta_3$  インテグリンアンタゴニストの適切な例である。

## 【0688】

$\alpha_v \beta_3$  インテグリンに対する抗体LM609もまた、腫瘍後退を誘導する。インテグリン $\alpha_v \beta_3$  アンタゴニスト（例えば、LM609）は、新脈管形成性内皮細胞のアポトーシスを誘導して、静止状態の血管に影響を受けないままにする。LM609または他の $\alpha_v \beta_3$  アンタゴニストはまた、 $\alpha_v \beta_3$  とMMP-2（MMP-2は、内皮細胞および線維芽細胞の移動に重要な役割を果たすと考えられるタンパク質分解性の酵素である）との相互作用を阻害することによって作用し得る。米国特許第5,753,230号は、新脈管形成を阻害するために本発明と組み合わせるための $\alpha_v \beta_3$ （ビトロネクチン $\alpha_v \beta_3$ ）に対する抗体を記載するために参考として本明細書中で具体的に援用される。

## 【0689】

この場合の新脈管形成性内皮のアポトーシスは、残りの血管網に対するカスケード効果を有し得る。腫瘍の拡大しようとするシグナルに対して腫瘍血管網が完全に応答するのを阻害することは、実際には、その血管網の部分的または完全な崩壊を開始して、腫瘍細胞の死および腫瘍容積の減少を生じる。エンドスタチンおよびアンギオスタチンが類似の様式で機能することが可能である。LM609が静止状態の血管に影響を与えないが腫瘍後退を引き起こし得るという事実は、腫瘍中の全ての血管が、抗腫瘍効果を得るために処置の標的とされる必要があるわけではないということを強く示唆する。

## 【0690】

Tie2レセプターを介するシグナル伝達を変更することに基づく治療処置の方法もまた、例えば、Tie2活性化を遮断し得る可溶性Tie2レセプター（Linら、1998）を使用して、本発明と組み合わせ使用され得る。組

換えアデノウイルス遺伝子治療を使用するこのような構築物の送達は、癌を治療する際および転移を減少する際に効果的であることが示されている（Linら、1998）。

#### 【0691】

（G3. アポトーシス誘発因子）

VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3ベースの治療剤はまた、アポトーシスを誘発するための方法と有利に組合され得る。種々のアポトーシス誘発因子は、本発明の免疫結合体と組み合わせられて上記されている。任意のこのようなアポトーシス誘発因子は、本発明の抗体に連結されることなく、本発明と組み合わせられて使用され得る。

#### 【0692】

免疫結合体として上記されるアポトーシス誘発因子の他に、アポトーシス、すなわちプログラムされた細胞死を阻害する多くの癌遺伝子が記載されている。この範疇における例示的な癌遺伝子としては、bcl-2（bcl-1、サイクリンD1と異なる；GenBank登録番号M14745，X06487；米国特許第5,650,491号；および同第5,539,094号；各々は、参考として本明細書中に援用される）およびBcl-x1、Mcl-1、Bax、A1、A20を含むファミリーのメンバーが挙げられるがこれらに限定されない。bcl-2の過剰発現は、T細胞リンパ腫において最初に発見された。bcl-2は、Bax（アポトーシス経路中のタンパク質）に結合し、そしてBaxを不活性化することによって癌遺伝子として機能する。bcl-2機能の阻害は、Baxの不活性化を妨げ、そしてアポトーシス経路を進行させる。

#### 【0693】

このクラスの癌遺伝子の阻害（例えば、アンチセンスヌクレオチド配列を使用する）は、アポトーシスの増強が所望される局面において、本発明での使用が意図される（米国特許第5,650,491号；同第5,539,094号および同第5,583,034号；各々は、参考として本明細書中に援用される）。

#### 【0694】

（G4. イムノトキシンおよびコアグリガンド）

本発明の抗アミノリン脂質結合体に基づく処置方法は、他のイムノトキシンおよび／またはコアグリガンドと組合せて使用され得、ここで、その標的化をする部分（例えば、抗体またはリガンド）は、腫瘍細胞、腫瘍脈管構造または腫瘍支質の比較的特異的なマーカーに指向される。上記に議論した化学療法剤および抗新脈管形成剤に共通して、他の標的化された毒素または凝固剤の併用した使用は、一般に、相加的であり、相加的よりも顕著に大きく、またはさらには相乗的な、抗腫瘍の結果を生じる。

#### 【0695】

一般的に言えば、本発明のこれらのさらなる局面での使用のための抗体またはリガンドは、好ましくは、接近可能な腫瘍抗原を認識し、これらは、優先的に、または具体的には腫瘍部位で発現される。抗体またはリガンドはまた、好ましくは高い親和性の特性を示し；そして抗体、リガンド、またはそれらの結合体は、生存を持続させる正常細胞（例えば、心臓、腎臓、脳、肝臓、骨髄、結腸、乳房、前立腺、甲状腺、胆嚢、肺、副腎、筋肉、神経線維、脾臓、皮膚、またはヒト体内の他の生存を維持させる器官もしくは組織）から選択される1以上の組織に対するインビボでの有意な副作用を発揮しない。本明細書中で使用される場合、用語「有意な副作用」は、インビボで投与される場合に、無視可能なまたは臨床的に管理し得る副作用（例えば、化学療法の間通常遭遇する副作用）のみを生じる、抗体、リガンドまたは抗体結合体をいう。

#### 【0696】

本発明と組合せて使用されるこれらの第二の抗癌剤の少なくとも1つの結合領域は、腫瘍領域への毒素または凝固因子を送達し得る（すなわち、腫瘍部位内へ局在し得る）成分である。このような標的化する薬剤は、腫瘍細胞、腫瘍脈管構造または腫瘍支質の成分に対して指向され得る。この標的化する薬剤は、一般に、腫瘍細胞、腫瘍脈管構造または腫瘍支質の、表面に発現されるか、表面に接近可能か、または表面に局在される成分に結合する。しかし、一旦、腫瘍脈管構造および腫瘍細胞の破壊が始まると、内部成分は放出され、実質的に任意の腫瘍成分のさらなる標的化を可能にする。

#### 【0697】

多くの腫瘍細胞抗原が記載されており、そのいずれの抗原も、本発明の併用される局面と関連して標的として使用され得る。さらなるイムノトキシンおよびコアグリガンドの標的化のための適切な腫瘍細胞抗原は、抗体B3（米国特許第5,242,813号；参考として本明細書中に援用される；ATCC HB 10573）；KSI/4（米国特許第4,975,369号；参考として本明細書中に援用される；ベクターNRRL B-18356および／またはNRRL B-18357を含む細胞から得られる）；260F9（ATCC HB 8488）；およびD612（米国特許第5,183,756号；参考として本明細書中に援用される；ATCC HB 9796）によって認識される抗原を含む。当業者は、抗腫瘍細胞抗体を産生する他の適切な細胞株を同定するために、任意の後年のATCCカタログもまた調べ得る。

#### 【0698】

腫瘍脈管構造標的化のために、標的化する抗体またはリガンドは、しばしば、血管形成された腫瘍の腫瘍内血管によって発現されるか、それに吸着されるか、その上に誘導されるか、またはさもなければそこに局在されるマーカーに結合する。適切に発現される標的分子としては、例えば、エンドグリン、E-セ렉チン、P-セ렉チン、VCAM-1、ICAM-1、PSMA（Liuら、1997）、TIE、LAM-1に反応性のリガンド、VEGF/VPFレセプター、FGFレセプター、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリン、プレイオトロピン（pleiotropin）、およびエンドシアリン（endosialin）が挙げられる。吸着される適切な標的は、例えば、VEGF、FGF、TGF $\beta$ 、HGF、PF4、PDGF、TIMP、TIEに結合するリガンド、および腫瘍関連フィブロネクチンアイソフォームのような標的である。例えば、以下のような、サイトカインおよび凝固剤によって自然におよび人工的に誘導され得る抗原もまた標的化され得る；ELAM-1、VCAM-1、ICAM-1、LAM-1に反応性のリガンド、エンドグリン、さらにMHCクラスII（例えば、IL-1、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-4および／またはTNF- $\beta$ によって、サイトカイン誘導性）；ならびにE-セ렉チン、P-セ렉チン、PDGFおよびICAM-1（例えば、トロンビン、第IX/Xa因子、第X/Xa因子および／または

プラスミンによって、凝固剤誘導性)。

#### 【0699】

以下の特許および特許出願は、腫瘍脈管構造の発現された、吸着された、誘導された、または局在されたマーカーに対して指向されるイムノトキシンの調製および使用に関する本発明の教示をなおさらに補完する目的のために、参考として本明細書中に具体的に援用される：米国出願第08/482,369号(1998年10月20日に登録料支払済)米国特許第5,855,866号、同第5,965,132号、同第6,051,230号、同第6,004,555号、同第5,877,289号、同第6,004,554号、同第5,776,427号、同第5,863,538号、同第5,660,827号および同第5,036,955号。

#### 【0700】

さらなる腫瘍血管標的組成物および方法は、これらの標的アミノリン脂質(例えば、ホスファチジルセリンおよびホスファチジリエタノールアミン(近年、腫瘍血管のアクセス可能かつ特異的なマーカーであることが発見された))を含む。抗アミノリン脂質抗体のみの投与は、血栓症および腫瘍の後退を誘発するに十分である。従って、本発明は、非接合体、抗ホスファチジルセリンおよび/またはホスファチジリエタノールアミン抗体；またはこのような抗体の免疫接合体が使用され得る。

#### 【0701】

以下の仮出願は、抗アミノリン脂質抗体およびイムノトキシンの調製および使用に関する本発明の教示をなおさらに補完する目的のために、参考として本明細書中に具体的に援用される：仮出願第60/092,672号(1998年7月13日出願)および同第60/092,589号(1998年7月13日出願)。出願番号60/092,589号はさらに、腫瘍血管に対する毒物および凝血薬を送達する際の使用のため、ならびに血栓症および腫瘍の後退を増加するために、アミノリン酸脂質結合タンパク質接合体(例えば、アネキシン接合体)の使用に関する本発明の教示をなおさらに補完する目的のために、参考として本明細書中に具体的に援用される。

## 【0702】

適切な腫瘍支質標的としては、腫瘍細胞外マトリックスもしくは支質の成分、またはその中に結合される以下を含む成分が挙げられる；基底膜マーカー、I V型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸、プロテオグリカン、フィブロネクチン、活性化血小板、L I B Sおよびテネイシン。このような使用に好ましい標的は、R I B Sである。

## 【0703】

以下の特許および特許出願は、腫瘍支質を標的する薬剤の調製および使用に関する本発明の教示をなおさらに補完する目的のために、参考として本明細書中に具体的に援用される：米国特許第5, 877, 289号ならびに米国特許出願第08/482, 369号（米国特許第5, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_号；登録料支払済）；同第08/485, 482号；同第08/487, 427号（米国特許第6, 004, 555号）；同第08/479, 733号（米国特許第5, 877, 289号）；同第08/472, 631号および同第08/479, 727号および同第08/481, 904号（米国特許第6, 036, 955号）。

## 【0704】

第2の抗癌治療剤は、V E G F R 2ーブロッキング剤、抗V E G F抗体または2 C 3ベースのイムノトキシンにおける使用について本明細書中に記載される任意の細胞傷害性薬剤またはさもないければ抗細胞性薬剤に作動可能に結合され得る。しかし、適切な抗細胞性薬剤はまた、放射性同位体を含む。リシンA鎖および脱グリコシル化A鎖（d g A）またはさらにゲロニン（g e l o n i n）のような毒素部分が好ましい。任意の1以上のアンジオポエチン、またはその融合物はまた、併用療法のための第2の免疫結合体（i m m u n o c o n j u g a t e）の一部として用いられ得る。

## 【0705】

本発明での任意の使用のための第2の標的化された因子は、凝固を促進し得る標的化された成分（すなわち、コアグリガンド）を含み得る。ここで、この標的化する抗体またはリガンドは、直接的または間接的に（例えば、別の抗体を介して）、直接的または間接的に凝固を刺激する任意の因子（V E G F R 2ーブロッ

キング剤、抗VEGF抗体または2C3ベースのコアグリガンドにおける使用について本明細書中に記載された因子のいずれかを含む)に連結され得る。このような使用のために好ましい凝固因子は、組織因子(TF)およびTF誘導体(例えば、短縮型TF(tTF)、二量体および多量体TF、ならびに第VII因子活性化能が欠損した変異TF)である。

#### 【0706】

癌の処置における併用使用のためのイムノトキシンおよびコアグリガンドの有効用量は、1週間あたり約1回の頻度でIV経路を介して投与する場合、約0.1mg/kgと約2mg/kgとの間、そして好ましくは約0.8mg/kgと約1.2mg/kgとの間である。用量決定におけるいくつかの変動が、処置される被験体の状態に依存して必ず生じる。投与の責任を負う医師は、個々の被験体について適切な用量を決定する。

#### 【0707】

(G5. ADEPTおよびプロドラッグ治療)

本発明のVEGFR2ブロッキング剤、抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体は、プロドラッグと組み合わせて使用され得、ここでVEGFR2ブロッキング剤、抗VEGF抗体または2C3ベースの抗体は、プロドラッグ活性化成分(例えば、抗体に接触した際にのみ、プロドラッグをより活性な形態へ変換するプロドラッグ活性化酵素)と作動可能に付随される。この技術は、一般に「ADEPT」と称され、そして例えば、WO95/13095;WO97/26918、WO97/24143および米国特許第4,975,278号および同第5,568,568号(これらは、各々具体的に本明細書中に参考として援用される)において記載される。

#### 【0708】

本明細書中で使用される場合、用語「プロドラッグ」は、プロドラッグに基づく親の薬物と比較して(腫瘍血管内皮細胞を含む)標的細胞に対する減少した細胞傷害性または他の抗細胞性効果を及ぼす生物学的にかまたは薬学的に活性な物質の前駆体または誘導体形態をいう。好ましくは、プロドラッグまたは前駆体形態は、有意な減少を及ぼすか、またはより好ましくは、「ネイティブ」または親

の形態と比較して、無視できる細胞傷害性または抗細胞性効果を及ぼす。「プロドラッグ」は、活性化されているかまたは変換されて、その薬物のより活性な親の形態を生じ得る。

#### 【0709】

薬物を作製しそして使用する技術的能力は、当業者の範囲内である。Williamら(1986)およびStellaら(1985)は、種々のプロドラッグの作製方法および使用方法に関する記載および技術をさらに供給する目的のために参考として本明細書中に各々具体的に援用される。本発明の文脈で使用され得る例示的なプロドラッグ構築物としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：ホスフェート含有プロドラッグ(米国特許第4,975,278号)、チオホスフェート含有プロドラッグ、サルフェート含有プロドラッグ、ペプチドベースのプロドラッグ(米国特許第5,660,829号；同第5,587,161号；同第5,405,990号；WO97/07118)、D-アミノ酸改変プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ(米国特許第5,561,119号；同第5,646,298号；同第4,904,768号、同第5,041,424号)、 $\beta$ ラクタム含有プロドラッグ、必要に応じて置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグ(米国特許第4,975,278号)、必要に応じて置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグおよびさらには5-フルオロシトシン(米国特許第4,975,278号)および5-フルオロウリジンプロドラッグなど(これらの特許の各々は、本明細書中に参考として具体的に援用される)。

#### 【0710】

プロドラッグの形態で使用され得る治療剤または細胞傷害性薬物の型は、実質的には限られる。より細胞傷害性薬剤は、このような送達の形態には好ましく、たとえば、コアグラント(プロドラッグとしての使用にあまり好ましくない)の送達より好ましい。プロドラッグが実質的に不活性であり、そして「放出された」かまたは活性化された薬物が、実質的にかまたは意図される目的のための活性を有するように構築物を設計することが、プロドラッグの形成において必要とされる全てである。



## 【0711】

もとのプロドラッグに関する種々の改良もまた、WO 95/038380；EP 751, 144（アントラサイクリン）；WO 97/07097（シクロプロピルインドール）；およびWO 96/20169に開示されるように、公知でありかつ本明細書との使用について意図される。例えば、Kmが減少したプロドラッグは、米国特許第5, 621, 002号（本明細書中に参考として特に援用される）に記載され、これは本発明の状況において使用され得る。細胞内にて実行されるプロドラッグ治療もまた、WO 96/03151（本明細書中に参考として特に援用される）に例示されるように公知であり、そして本明細書を用いて実施され得る。

## 【0712】

ADEPTにおける使用のために、そのプロドラッグをより活性な薬物へと活性化または変換する因子が、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3に基づく抗体に作動可能に結合される。従って、このVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3様抗体は、脈管形成部位内、好ましくは腫瘍血管系および支質内で、プロドラッグ変換能力を局在化し、活性薬物がそのような領域のみで産生され、そして循環中または健常組織においては産生されないようにする。

## 【0713】

VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3様抗体に結合してプロドラッグ活性化にて機能し得る酵素としては、ホスフェート含有プロドラッグと組み合わせた使用のためのアルカリホスファターゼ（米国特許第4, 975, 278号）；スルフェート含有プロドラッグと組み合わせた使用のためのアリールスルファターゼ（米国特許第5, 270, 196号）；ペプチドに基づくプロドラッグと組み合わせた使用のためのペプチダーゼおよびプロテアーゼ（例えば、セラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ（米国特許第5, 660, 829号；同第5, 587, 161号；同第5, 405, 990号）およびカテプシン（カテプシンBおよびLを含む））；D-アミノ酸修飾プロドラッグと組み合わせた使用のためのD-アラニルカルボキシペプチダーゼ；グリコシル化プロドラッグと組み合わせた使用のための炭水化物切断酵素（例

例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼ) (米国特許第5, 561, 119号; 同第5, 646, 298号);  $\beta$ -ラクタム含有プロドラッグと組み合わせた使用のための $\beta$ -ラクタマーゼ; アミノ窒素にてフェノキシアセトアミド基またはフェニルアセトアミド基で誘導体化された薬物と組み合わせた使用のためのペニシリンアミダーゼ (例えば、ペニシリンVアミダーゼ (米国特許第、975, 278号) またはペニシリンGアミダーゼ); ならびに5-フルオロシトシンに基づくプロドラッグ (米国特許第4, 975, 278号) と組み合わせた使用のためのシトシンデアミナーゼ (米国特許第5, 338, 678号; 同第5, 545, 548号) が、挙げられるがこれらに限定されず、これらの特許各々は、本明細書中に参考として特に援用される。

#### 【0714】

酵素活性を有する抗体 (触媒抗体または「アブザイム」として公知) もまた、プロドラッグを活性な薬物へと変換するために使用され得る。従って、VEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3様抗体に基づくアブザイムは、本発明の別の局面を形成する。アブザイムを生成する技術的能力もまた、Masseyら (1987) (このアブザイムの教示を補足する目的で、本明細書中に参考として特に援用される) に例示されるように、当業者の範囲内に存在する。カルバメート位置 (例えば、窒素マスタードアリールカルバメート) でプロドラッグの分解を触媒し得る触媒抗体が、EP 745, 673 (本明細書中に参考として特に援用される) に記載されるように、さらに意図される。

#### 【0715】

##### (H. 診断法および画像化)

本発明はさらに、インビトロおよびインビボでの診断法および画像化法を提供する。このような方法は、いかなる脈管形成疾患についても (関節炎、乾癬および固形腫瘍により例証されるが、本明細書中に開示される脈管形成疾患すべてを含む) 診断情報、予後情報または画像情報を生成する際の使用に適用可能である。腫瘍診断および画像化の分野の外側で、本発明のこれらの局面は、インビトロでの診断試験 (好ましくは、サンプルが非侵襲的に得られかつ高スループットアッセイにて試験され得るか、そして/または曖昧および確認における臨床診断が

望まれるかのいずれか)における使用に最も好ましい。

#### 【0716】

(H1. 免疫検出法およびキット)

なおさらなる実施形態において、本発明は、VEGFを結合、精製、除去、定量さなければ一般には検出するため、そして脈管形成疾患を診断するための、免疫検出法に関する。本発明のVEGFR2-遮断抗VEGF抗体(例えば、2C3)が、インビボ(下記)にて、単離された組織サンプル、生検またはスワブにおいて、そして/またはホモジナイズされた組織サンプルにおいて、VEGFを検出するために使用され得る。このような免疫検出法は、明らかな診断的有用性を有するが、また、非臨床サンプルに(例えば、抗原サンプルの力価測定などにおいて)も適用を有する。

#### 【0717】

種々の有用な免疫検出法の工程は、科学文献(例えば、Nakamuraら、(1987、本明細書中に参考として援用される))に記載されている。一般には、免疫結合法は、VEGFを含むと疑われるサンプルを得る工程、およびそのサンプルをVEGFR2-遮断抗VEGF抗体(例えば、2C3)と、免疫複体の形成を可能にするに有効な条件下で接触させる工程を包含する。このような方法において、その抗体は、固体支持体に、例えば、カラムマトリックスの形態で結合され得、そしてVEGFを含むと疑われるサンプルが、その固定された抗体に適用される。

#### 【0718】

より好ましくは、その免疫結合法は、サンプル中のVEGFの量を検出または定量するための方法を含み、この方法は、結合プロセスの間に形成されたすべての免疫複体の検出または定量を必要とする。ここで、VEGFを含むと疑われるサンプルを得、そしてそのサンプルを、本明細書に従う抗体と接触させ、次いで、特定の条件下で形成された免疫複体の量を検出または定量する。

#### 【0719】

分析される生物学的サンプルは、VEGFを含むと疑われる任意のサンプルであり得、一般的には、脈管形成疾患を有すると疑われる動物または患者由来であ

る。そのサンプルは、組織切片または標本、生検、スワブまたはスミア試験サンプル、ホモジナイズされた組織抽出物、あるいはそのようなものの分離形態または精製形態であり得る。

#### 【0720】

免疫複合体（一次免疫複合体）の形成を可能にするに有効な条件下でかつそれを可能にするに十分な時間の間、選択した生物学的サンプルをその抗体と接触させることは、一般には、そのサンプルに抗体組成物を単に添加し、そして存在するすべてのVEGFとその抗体が免疫複合体を形成する（すなわち、結合する）に十分に長い時間その混合物をインキュベートすることである。この時点の後、そのサンプルー抗体組成物（例えば、組織切片、ELISAプレート、ドットブロット、またはウェスタンブロット）が、一般には洗浄されて、非特異的結合したすべての抗体種が除去されて、一次免疫複合体中の特異的に結合した抗体のみ検出することが可能になる。

#### 【0721】

免疫複合体の検出は、当該分野で周知であり、そして多数のアプローチの適用を介して達成され得る。これらの方法は、一般的には、標識またはマーカー（例えば、当該分野で公知の任意の放射性、蛍光性、生物学的または酵素的な、タグもしくは標識）の検出に基づく。このような標識の使用に関する米国特許としては、第3,817,837号；同第3,850,752号；同第3,939,350号；3,996,345号；同第4,277,437号；同第4,275,149号および同第4,366,241号（各々が、本明細書中で参考として援用される）が挙げられる。色素形成基質との接触に際して有色生成物を生成する酵素の使用が、一般的に好ましい。二次結合リガンド（例えば、第2の抗体またはビオチン／アビジンリガンド結合配置）もまた、当該分野で公知であるように、使用され得る。

#### 【0722】

検出において使用されるVEGFR2遮断抗VEGF抗体（例えば、2C3）自体は、検出可能な標識に連結され得、次いでこの標識が簡単に検出され、それにより組成物中の一次免疫複合体の量を決定することが可能になる。

## 【0723】

好ましくは、この一次免疫複合体は、本発明の抗体について結合親和性を有する第2の結合リガンドによって検出される。この場合において、その第2の結合リガンドは、検出可能な標識に連結され得る。この第2の結合リガンド自体は、しばしば抗体であり、従って、「二次」抗体と呼ばれ得る。この一次免疫複合体は、この標識された二次結合リガンドまたは抗体と、二次免疫複合体の形成を可能にするに有効な条件下かつそれを可能にするに十分な時間の間、接触される。次いで、この二次免疫複合体は、一般的には、非特異的に結合したすべての標識二次抗体またはリガンドを除去するために洗浄され、次いでその二次免疫複合体中の残りの標識が検出される。

## 【0724】

さらなる方法は、2工程アプローチによる一次免疫複合体の検出を含む。第1の抗体に結合親和性を有する第2の結合リガンド（例えば、抗体）が、上記のように二次免疫複合体を形成するために使用される。洗浄の後、その二次免疫複合体は、その第2の抗体に結合親和性を有する第3の結合リガンドまたは抗体と、免疫複合体（三次免疫複合体）の形成を可能にするに有効な条件下かつそれを可能にするに十分な時間、接触させられる。この第3のリガンドまたは抗体は、そのようにして形成された三次免疫複合体の検出を可能にする、検出可能な標識に連結される。この系は、所望ならば、シグナル増幅を提供し得る。

## 【0725】

脈管形成疾患を有する患者の臨床診断またはモニタリングにおいて、VEGFの検出、または正常な被検体由来の対応する生物学的サンプルにおけるレベルと比較したVEGFのレベルの増加が、脈管形成疾患を有する患者の指標である。

## 【0726】

しかし、当該分野で公知であるように、このような臨床診断は、この方法に基礎づいて孤立しては行われまいだろう。当業者は、バイオマーカーの有意な発現（ポジティブな同定を示す）とバイオマーカーの低レベル発現またはバックグラウンド発現との間を識別することに非常に精通している。実際、バックグラウンド発現レベルは、しばしば、「カットオフ」を形成するために使用され、この

カットオフを超える染色の増加が、有意またはポジティブと記録される。

#### 【0727】

##### (H2. 画像化)

本発明のこれらの局面は、腫瘍画像化方法ならびに組み合わせた腫瘍処置および画像化方法における使用に好ましい。一つ以上の検出可能な因子に結合させた VEGFR2 遮断抗 VEGF 抗体または 2C3 に基づく抗体は、それ自体が腫瘍の画像化においてか、または腫瘍のプレ画像化に使用して、処置の前に信頼性のある画像を形成することが構想される。このような組成物および方法はまた、他の任意の脈管形成疾患または状態（特に、非悪性腫瘍、アテローム性動脈硬化症、そして内部画像化が診断目的または予後目的について望まれる状態または処置を設計するために望まれる状態）の画像化および診断に適用され得る。

#### 【0728】

VEGFR2 遮断抗 VEGF 抗体または 2C3 に基づく画像化抗体は、一般的に、検出可能な標識に作動可能に付着したかもしくは結合した VEGFR2 遮断抗 VEGF 抗体または 2C3 に基づく抗体を含む。「検出可能な標識」は、それらの特異的な機能特性、または化学的特徴に起因して検出され得る化合物あるいはエレメントであり、その使用により、それらが付着する成分が検出可能になり、そして所望であれば、さらに定量可能になる。インビボでの診断プロトコルまたは「画像化方法」のための抗体結合体において、非侵襲的方法を用いて検出され得る標識が必要である。

#### 【0729】

抗体および結合リガンドにそれらを付着させる方法のような多くの適切な画像化剤が、当該分野において公知である（例えば、米国特許第 5,021,236 号および同第 4,472,509 号を参照のこと。両方とも本明細書中に参考として援用される）。特定の付着方法は、例えば、抗体に付着された DTPA のような有機キレート剤を使用する金属キレート複合体の使用を含む（米国特許第 4,472,509 号）。モノクローナル抗体はまた、グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩のような結合剤の存在下で酵素と反応され得る。フルオレセインマーカースとの結合体は、これらの結合剤の存在下で、またはイソチオシアネートと

の反応により、調製される。

### 【0730】

検出可能な標識の例は、常磁性イオンである。この場合、適切なイオンとしては、以下が挙げられる：クロム（ $\text{I I I}$ ）、マンガン（ $\text{I I}$ ）、鉄（ $\text{I I I}$ ）、鉄（ $\text{I I}$ ）、コバルト（ $\text{I I}$ ）、ニッケル（ $\text{I I}$ ）、銅（ $\text{I I}$ ）、ネオジム（ $\text{I I I}$ ）、サマリウム（ $\text{I I I}$ ）、イッテルビウム（ $\text{I I I}$ ）、ガドリニウム（ $\text{I I I}$ ）、バナジウム（ $\text{I I}$ ）、テルビウム（ $\text{I I I}$ ）、ジスプロシウム（ $\text{I I I}$ ）、ホルミウム（ $\text{I I I}$ ）、およびエルビウム（ $\text{I I I}$ ）（ガドリニウムが特に好ましい）。

### 【0731】

他の状況（例えば、X線画像化）において有用なイオンは、以下を含むがそれらに限定されない：ランタン（ $\text{I I I}$ ）、金（ $\text{I I I}$ ）、鉛（ $\text{I I}$ ）および特にビスマス（ $\text{I I I}$ ）。蛍光標識には、ローダミン、フルオレセイン、およびレノグラフィンが挙げられる。ローダミンおよびフルオレセインは、しばしば、イソチオシアネート中間体を介して結合される。

### 【0732】

診断的適用のための放射性同位体の場合、適切な例としては、以下が挙げられる： $^{14}\text{C}$ 炭素、 $^{51}\text{Cr}$ クロム、 $^{36}\text{Cl}$ 塩素、 $^{57}\text{Co}$ コバルト、 $^{58}\text{Co}$ コバルト、 $^{67}\text{Cu}$ 銅、 $^{152}\text{Eu}$ Eu、ガリウム、 $^{67}\text{Ga}$ ガリウム、 $^3\text{H}$ 水素、 $^{123}\text{I}$ ヨウ素、 $^{125}\text{I}$ ヨウ素、 $^{131}\text{I}$ ヨウ素、 $^{111}\text{In}$ インジウム、 $^{59}\text{Fe}$ 鉄、 $^2\text{Li}$ リチウム、 $^{186}\text{Re}$ レニウム、 $^{188}\text{Re}$ レニウム、 $^{75}\text{Se}$ セレンウム、 $^{35}\text{S}$ 硫黄、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ テクネチウム、および $^{90}\text{Y}$ イットリウム。 $^{125}\text{I}$ は、しばしば、特定の実施形態において使用するために好ましく、そして $^{99\text{m}}\text{Tc}$ および $^{111}\text{In}$ はまた、しばしば、それらが低エネルギーでありかつ広範囲での検出に適しているために好ましい。

### 【0733】

本発明における使用のための放射性標識されたVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3に基づく抗体が、当該分野で周知の方法により生成され得る。例えば、放射性同位体金属イオンを抗体に結合するために、しばしば使用される中間体官能基は、ジエチレントリアミンペンタ酢酸（DTPA）およびエチレンジ

アミンテトラ酢酸（EDTA）である。

#### 【0734】

モノクローナル抗体はまた、ヨウ化ナトリウムまたはヨウ化カリウム、および次亜塩素酸ナトリウムのような化学的酸化剤、またはラクトペルオキシダーゼのような酵素酸化剤と接触することによりヨウ素化され得る。本発明による抗体は、リガンド交換プロセスにより、例えば、二価のスズの溶液で過テクネチウム酸（*pertechnetate*）を還元し、Sephadexカラム上でその還元されたテクネチウムをキレート化し、そしてこのカラムに抗体を適用することにより、テクネチウム<sup>99m</sup>で標識され得る；かまたは直接的標識技術により、例えば、過テクネチウム酸、 $\text{SnCl}_2$ のような還元剤、ナトリウム-カリウムフタレート溶液のような緩衝溶液、およびその抗体をインキュベートすることにより、標識され得る。

#### 【0735】

検出可能に標識されたVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3に基づく抗体の上記の型のいずれも、本発明の画像化の局面または組み合わせた画像化および処置の局面において使用され得る。これらは、インビトロでの診断における使用に等しく適切である。インビボでの画像化実施形態のための投薬量は、一般的には、治療用よりも少ないが、また患者の年齢および重量にも依存する。1回の用量は、十分であるべきである。

#### 【0736】

インビボ診断方法または画像化方法は、一般的に、非侵襲的方法により検出可能であるマーカーに結合されたVEGFR2遮断抗VEGF抗体または2C3に基づく抗体の診断的有効量を患者に投与する工程を含む。この抗体-マーカー結合体は、腫瘍内のVEGFに局在化しそして結合するに十分な時間放置される。次いで、患者は、検出可能なマーカーを同定するために検出デバイスに曝露され、それにより、腫瘍の画像を形成する。

#### 【0737】

（H3．診断キット）

なおさらなる実施形態において、本発明は、免疫検出キットおよび画像化キッ



トの両方を含む、上記の免疫検出法および画像化方法との使用のための、診断キットを提供する。従って、VEGFR2遮断抗VEGF抗体（例えば、2C3）が、一般的には適切な容器中に含まれて、キットにて提供される。

#### 【0738】

免疫検出のために、この抗体は、固体支持体（例えば、マイクロタイタープレートウェル）に結合され得るが、抗体溶液または再構成のための粉末が好ましい。この免疫検出キットは、好ましくは、少なくとも第1の免疫検出試薬を含む。このキットの免疫検出試薬は、種々の形態（所定の抗体と会合しているかまたは所定の抗体に結合している、検出可能な標識を含む）のいずれか1つを採り得る。二次結合リガンドに会合または結合している検出可能な標識もまた、意図される。例示的二次リガンドは、第1の抗体に結合親和性を有する二次抗体である。

#### 【0739】

本キットにおける使用のためのさらに適切な免疫検出試薬は、第1の抗体について結合親和性を有する二次抗体を、その第2の抗体についての結合親和性を有する第3の抗体とともに含む、二成分試薬を含み、その第3の抗体は、検出可能な標識に連結されている。上記のように、多数の例示的標識が当該分野で公知であり、そしてこのような標識すべてが、本発明とともに使用され得る。これらのキットは、完全に結合した形態で、中間体の形態で、またはそのキットのユーザーにより結合される別個の部分としてのいずれかで、抗体-標識結合体を含み得る。

#### 【0740】

その画像化キットは、好ましくは、VEGFR2遮断抗VEGF抗体（例えば、2C3）（インビボで検出可能な標識にすでに結合している）を含む。しかし、その標識および結合手段は、別個に供給され得る。

#### 【0741】

いずれのキットも、さらに、VEGFの適切にアリコートにされた組成物のような制御因子（標識されいても標識されていなくても）を、検出アッセイのための標準曲線を調製するために使用され得るように、含む。このキットの成分は、

水性媒体または凍結乾燥形態のいずれかにて、パッケージされ得る。

【0742】

そのキットの容器手段は、一般的には、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、瓶、シリンジ、または他の容器手段を含み、その中に、抗体または抗原が配置され得、そして好ましくは適切なアリコートにされ得る。第2または第3の結合リガンドまたはさらなる成分が提供される場合、そのキットはまた、一般的には、このリガンドまたは成分が配置され得る、第2、第3、または他のさらなる容器を含む。このキットはまた、1つ以上の脈管形成疾患のいずれかの診断における使用のための他の診断試薬を含み得る。好ましくは、VEGF結合に基づかない第2の診断剤が、使用される。

【0743】

本発明のキットはまた、代表的には、その抗体を含むための手段、および市販のために密封されている他の任意の試薬容器を含む。このような容器は、所望のバイアルが保持されている射出成形または吹き込み成形したプラスチック容器を含み得る。

【0744】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。以下の実施例に開示される技術は、本発明者らによって、本発明の実施において良好に機能することが見出された技術を表し、従って、本発明の実施の好ましい形態を構成するとみなされ得ることが、当業者によって認識されるべきである。しかし、当業者は、本開示を考慮して、多くの変更が、開示された特定の実施形態において行われ得、そして本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく同様にしくは類似の結果が依然として入手され得ることを認識すべきである。

【0745】

(実施例I)

(抗VEGF抗体2C3の生成および特有の特徴)

(A. 材料および方法)

(1. 免疫原)

ヒトVEGF (huVEGF; 配列番号10) のN末端26アミノ酸に対応す

るペプチドおよびモルモット VEGF (gpVEGF; 配列番号11) のN末端25アミノ酸に対応するペプチドが、Biopolymers Facility of the Howard Hughes Medical Institute, UT Southwestern Medical Center, Dallasにより合成された。このペプチドは、以下の配列(NからCへ)

【0746】

【化1】

APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYC; 配列番号10および

APMAEGEQKPREVVVKFMDVYKRSYC; 配列番号11

【0747】

を有した。

【0748】

ペプチドを、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ-1-カルボキシレート(SMCC)リンカー(Pierce, Rockford, IL)を使用して、C末端のシステインを介してサイログロブリンに結合した。サイログロブリンに結合したL-システインからなるコントロール結合体もまた調製した。結合体を、サイズ排除クロマトグラフィーにより、遊離ペプチドまたはリンカーから分離した。

【0749】

組換えヒトVEGFもまた、免疫原として使用した(S. Ramakrishnan博士、University of Minnesota, Minneapolis, MNから得た)。

【0750】

(2. ハイブリドーマ)

抗gpVEGF抗体産生ハイブリドーマの産生のために、C57/B1-6マウスに、TiterMaxアジュバント(CytRX Co., Norcross

s、GA)中のgpVEGF-ペプチド-サイログロブリン結合体で免疫した。抗ヒトVEGF抗体の産生のために、BALB/cマウスに、TiterMax中のhuVEGF-ペプチド-サイログロブリン結合体または組換えヒトVEGFのいずれかで免疫した。3日後、最終ブースト脾細胞を、Morrowら(1990; 本明細書中に参考として援用される)により記載されるように、ミエローマP3X63AG8.653(American Type Culture Collection、Rockville、MD)細胞と融合し、そして培養した。

#### 【0751】

##### (3. 抗体精製)

IgG抗体(2C3、12D7、3E7)を、硫酸アンモニウム沈殿およびプロテインAクロマトグラフィーによって、Pierce ImmunoPure Binding/Elution緩衝系(Pierce)を使用して、組織培養上清から精製した。

#### 【0752】

IgM抗体(GV39M、11B5、7G3)を、50%飽和硫酸アンモニウム沈殿、PBS(pH7.4)中でのペレットの再懸濁およびdH<sub>2</sub>Oに対する透析により組織培養上清から精製し、真性グロブリンを沈殿させた。このdH<sub>2</sub>O沈殿物をPBS中に再懸濁し、そしてSephacrose S300カラム(Pharmacia)におけるサイズ排除クロマトグラフィーによって分画した。そのIgM画分は、SDS-PAGEにより判定した場合、85~90%の純度であった。

#### 【0753】

##### (4. コントロール抗体)

以下を含む、種々のコントロール抗体を、これらの研究を通して使用した:mAb 4.6.1(Genentech, Inc. 製のマウス抗ヒトVEGF)、Ab-3(Oncogene Science, Inc. 製のマウス抗ヒトVEGF)、A-20(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA製のウサギ抗ヒトVEGF)、OX7(Dr

. A. F. Williams, MRC Cellular Immunology Unit, Oxford, UKからのマウス抗ラットThy1.1)、MTSA (Dr. E. S. Vitetta, UT-Southwestern, Dallas, TX製の無関係な特異性のマウス骨髄腫IgM)、1A8 (マウス抗マウスFlk-1; Philip E. Thorpeおよび共同研究者)、MECA 32 (Dr. E. Butcher, Stanford University, Stanford, CAからのラット抗マウス内皮) およびTEC 11 (マウス抗ヒトエンドグリン (endoglin); 米国特許第5,660,827号)。

#### 【0754】

##### (5. 最初のスクリーニング)

最初のスクリーニングのために、96ウェルELISAプレート (Falcon, Franklin Lakes, NJ) を、250ngのVEGFペプチドまたはVEGF-Cys-サイログロブリン結合体のいずれかでコートし、そして5%カゼイン酸加水分解物 (Sigma, St. Louis, MO) でブロックした。抗gpVEGFハイブリドーマおよび最初の抗ヒトVEGFハイブリドーマ由来の上清を、二重間接的 (dual indirect) ELISA技術によって、この抗原でコートしたプレート上でスクリーニングした (Crowther, 1995)。

#### 【0755】

VEGFペプチド-サイログロブリンとの優先的な反応性を示すが、Cys-サイログロブリンとの反応性を全く示さないか、弱い反応性を示すハイブリドーマを、腫瘍組織の凍結切片に対する免疫組織化学 (以下に記載される) によって、さらにスクリーニングした。

#### 【0756】

##### (6. 免疫組織化学)

モルモット系統10肝細胞癌腫瘍細胞 (Dr. Ronald Neuman, NIH, Bethesda, MDより得た) を、系統2モルモット (NCI, Bethesda, MD) 中で増殖させた。ヒト腫瘍NCI-H358非小細胞肺

癌 (NSCLC)、NCI-H460 NSCLC (両方とも、Dr. Adi Gazdar, UT Southwestern, Dallas, TXより得た)、HT29結腸腺癌 (American Type Culture Collection)、およびL540CYホジキンリンパ腫 (V. Diehl教授、Cologne, Germanyから得た) を、CB17 SCIDマウス (Charles River, Wilmington, MA) 中に異種移植片として増殖させた。

#### 【0757】

腫瘍を、液体窒素中で瞬間凍結し、そして $-70^{\circ}\text{C}$ で保存した。患者由来の腫瘍標本の凍結サンプルを、National Cancer Institute Cooperative Human Tissue Network (Southern Division, Birmingham, AL) から得た。免疫組織化学を、Burrowsら (1995) に記載のように行った。

#### 【0758】

##### (7. ELISA分析)

VEGFで免疫した動物由来のハイブリドーマ上清を、以下の3つの異なる抗原を使用する示差の間接 (differential indirect) ELISA技術によってスクリーニングした：ヒトVEGF単独、VEGF:F1k-1/SEAP複合体、およびF1k-1/SEAP単独。ヒトVEGF単独について、特定のELISAプレートを、100ngのVEGFでコートした。

#### 【0759】

F1k-1/SEAP単独について、他のELISAプレートを、500ngのF1k-1/SEAP (マウスVEGFレセプターの可溶性形態 (F1k-1/SEAPを分泌する細胞は、Dr. Ihor Lemischka, Princeton University, Princeton, NJから得た)) でコートした。このF1k-1/SEAPタンパク質は、Tesslerら (1994) に記載のよう産生および精製した。基本的には、F1k-1の細胞外ドメイン (sF1k-1) を、*Spodoptera frugiperda* (Sf9) において産生し、そして、モノクローナル抗F1k-1抗体 (1A8) を

使用する免疫親和性技術によって精製した。次いで、s F l k - 1 をビオチン化し、そしてアビジンでコートしたプレート上に結合させた。

#### 【0760】

VEGF : F l k - 1 / S E A P 複合体でコートしたプレートを調製するために、精製 s F l k - 1 をビオチン化し、そして2, 5 : 1 の s F l k - 1 : V E G F のモル比で、結合緩衝液 (10 mM H E P E S、150 mM N a C l、20  $\mu$ g / ml ウシ血清アルブミンおよび0.1  $\mu$ g / ml ヘパリン) 中で、4℃で一晩、VEGF と反応させ、ダイマーを形成させた。次いで、この V E G F : s F l k - 1 複合体を、96 ウェルマイクロタイタープレートのアビジンでコートしたウェル中でインキュベートし、レセプターに結合した V E G F でコートしたプレートを生成した。

#### 【0761】

次いで、VEGF 単独、ビオチン化 s F l k - 1 および V E G F : s F l k - 1 複合体との、抗体の反応性を、アビジンでコートしたプレート上のこの3つの抗原を使用する、制御された研究において決定した。反応性を、最初のスクリーニングについて上記したように決定した。

#### 【0762】

捕捉 E L I S A もまた開発した。捕捉 E L I S A において、マイクロタイタープレートを、100 ng のその示された抗体で、4℃で一晩コートした。ウェルを、上記のように洗浄およびブロックし、次いで、種々の濃度のビオチン化 V E G F または V E G F : s F l k - 1 - ビオチンと共にインキュベートした。1 : 2000 希釈した、ペルオキシダーゼに結合体化されたストレプトアビジン (K i r k e g a a r d & P e r r y L a b o r a t o r i e s, I n c. ) を、第2の層として使用し、そして発色させた。

#### 【0763】

競合 E L I S A 研究を、製造業者の説明書 (E Z - L i n k A c t i v a t e d P e r o x i d a s e, P i e r c e) に従って、抗体をペルオキシダーゼで最初に標識することによって行った。12D7、3E7、2C3および7G3 との競合研究に使用した抗原は、E L I S A プレート上のアビジンによって捕

捉されるVEGF-ビオチンであった。約0.5～2.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のペルオキシダーゼ標識した試験抗体を、緩衝液単独、無関係なIgG、または10～100倍過剰の他の抗VEGF競合抗体のいずれかの存在下のプレート上でインキュベートした。

#### 【0764】

標識した抗体の結合を、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン (TMB) 基質 (KirkegaardおよびPerry Laboratories, Inc) の添加によって評価した。反応を、15分後に1M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ で停止し、そして450nmで分光光度的に読み取った。このアッセイを、標識した抗体および競合抗体の各組み合わせについて、少なくとも2回、3連で行った。2つ抗体が、互いの結合を80%より大きく交差ブロック (cross-block) した場合に、同じエピトープグループに存在するとみなした。

#### 【0765】

GV39Mおよび11B5は、ペルオキシダーゼ標識後、結合活性を保持しなかったが、ビオチン化に耐性であった。GV39Mおよび11B5をビオチン化し、そして抗Flk-1抗体 (1A8) によって捕捉されたか、またはELISAプレート上に直接的にコートした、VEGF:sFlk-1に対して試験した。

#### 【0766】

##### (8. ウェスタンブロット分析)

5%胎仔ウシ血清の存在下の精製組換えVEGFを、還元条件下および非還元条件下の12% SDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロースに転写した。このニトロセルロース膜を、Sea-Block PP82-41 (East Coast Biologicals, Berwick, ME) を使用してブロックし、そしてミニブロッター (mini-blotter) 装置 (Immunities, Cambridge, MA) を使用して、一次抗体をプローブした。適切なペルオキシダーゼ結合体二次抗体とのインキュベーション後、ECL増強化学発光によって、膜を発色させた。

#### 【0767】



## (B. 結果)

(1. 2C3は、固有のエピトープ特異性を有する)

表1は、異なる抗VEGF抗体のクラス/サブクラス、それらが認識するVEGF上のエピトープグループ、およびVEGFまたはVEGF:レセプター(VEGF:Flk-1)複合体への優先的結合についての情報を要約する。全ての例において、これらの抗体は、VEGF121およびVEGF165に等しくよく結合し、本質的に同じ結果を生じた。以下のこれらの結果は、他で明記されない限りVEGF165に対するものである。

【0768】

【表6】

表1 抗VEGF抗体特性の要約

<u>エピトープ グループ</u>	<u>クローン</u>	<u>アイソタイプ</u>	<u>VEGF 抗原原</u>	<u>優先的 反応性</u>
1	GV39M	IgM,k	Gp N- 末端	VEGF:Flk-1
1	11B5	IgM,k	Hu N- 末端	VEGF:Flk-1
2	3E7	IgG1,l	Hu N- 末端	VEGF and VEGF:Flk-1
2	7G3	IgM,k	Hu N- 末端	VEGF and VEGF:Flk-1
3	12D7	IgG1,k	Hu N- 末端	VEGF
4	2C3	IgG2a,k	rHuVEGF	VEGF
<sup>1</sup> ペプチド 89~94 周辺に 基中位に	A4.6.1	IgG1		VEGF

【0769】

1. エピトープグループを、競合的ELISAによって決定した。
2. マウスを、ヒトVEGFのN末端26アミノ酸(11B5、3E7、7G3および12D7)、モルモットVEGFのN末端25アミノ酸(GV39M)または全長組換えヒトVEGF(2C3)のいずれかに対応する合成ペプチドで免疫した。
3. 抗体を、VEGF単独との反応性、またはsFlk-1と結合したVEGF

(VEGF:Flk-1)との反応性について、間接的ELISAおよび捕捉ELISAにおいてスクリーニングした。

4. A4. 6. 1は、正確に規定されたエピトープを有し、これは、2C3によって認識されるエピトープグループ4とは異なる。A4. 6. 1研究は、Kimら、1992; Wiesmannら、1997; Mullerら、1998; およびKeyt、1996 (各々は、参考として本明細書中に援用される) に報告されている。

#### 【0770】

ビオチン化試験抗体またはペルオキシダーゼ標識試験抗体、および10～100倍過剰の非標識競合抗体を使用する、競合結合研究は、2C3が、固有のエピトープに結合することを示した。これらの研究は、GV39Mおよび11B5が、VEGF:Flk-1への互いの結合を交差ブロックすること、および3E7および7G3が、アビジン上に捕捉されたVEGF-ビオチンへの互いの結合を交差ブロックすることを、最初に明らかにした。GV39Mおよび11B5を、エピトープグループ1に任意に割り当て、一方、3E7および7G3を、エピトープグループ2に割り当てた。

#### 【0771】

2C3および残りの抗体12D7は、VEGFまたはVEGF:レセプターに対する互いの結合、またはそれらに対する残りの抗体の結合に有意に干渉しなかった。12D7を、エピトープグループ3に割り当て、そして2C3を、エピトープグループ4に割り当てた(表1)。

#### 【0772】

上記に作表したように、2C3は、抗体A4. 6. 1に対するエピトープとは異なるエピトープを認識する。本発明者らの競合研究は、2C3およびA4. 6. 1が、交差反応性ではないことを示した。A4. 6. 1によって認識されるエピトープはまた、正確に規定され、そしてアミノ酸89～94の周辺に集中する連続性のエピトープである(Kimら、1992; Wiesmannら、1997; Mullerら、1998; Keytら、1996 (各々は、参考として本明細書中に援用される))。2C3とA4. 6. 1の間には多くの公知の差異も

また、存在する（以下を参照のこと）。

【0773】

（2．2C3は、遊離のVEGFに結合する）

遊離形態および複合体形態の可溶性VEGFに結合する抗体の能力において、顕著な差異が存在する（表2）。これらの研究は、2C3の固有の性質の証拠をさらに提供する。表2は、GV39Mおよび11B5が、VEGF：レセプター複合体に対する強い選択性を提示し、最大半減結合（half-maximal binding）は、それぞれ、溶液中の遊離VEGFについては、400 nMおよび800 nMであるのに比べて、VEGF：Flk-1については、5.5 nMおよび2 nMで到達される。

【0774】

対照的に、2C3および12D7は、遊離VEGFに対する選択性を提示し、その最大半減結合は、VEGF：Flk-1複合体について、それぞれ、150 nMおよび250 nMであるのに比べて、それぞれ、1 nMおよび20 nMで到達される。しかし、2C3は、インビボ注射後に、腫瘍血管系および腫瘍支質に局在する（以下を参照のこと）。

【0775】

3E7は、遊離VEGFおよびVEGF：Flk-1複合体に等しく結合し、最大半減結合は、両方について1 nMで到達される。

【0776】

【表7】

表2. VEGF 対 VEGF:Flk-1 の ELISA 補正

クローン	最大結合の50%を 与える濃度 (nM) <sup>1</sup>		VEGF/VEGF:Flk-1 <sup>2</sup> の比
	VEGF	VEGF:Flk-1	
GV39M	400*	5.5	72.7
11B5	800*	2	400.0
3E7	0.9	1	0.9
12D7	20	250*	0.1
2C3	1	150	0.007
Mab 4.6.1 <sup>3</sup>	0.3	500*	0.0006
1A8	NR <sup>4</sup>	1.5	
コントロール	NR	600*	

\* 推定値

## 【0777】

1. 最大半減結合値は、ビオチン化 VEGF、および VEGF と複合体化したビオチン化 sFlk-1 を、その示された抗体でコートしたウェル上に対して3連で滴定し、次いで、ペルオキシダーゼ標識アビジンで発色させることによって測定した。

2. 1.0 より大きい比は、複合体 (VEGF : Flk-1) に対する抗体の選択性を示し、一方、1.0 未満の比は、VEGF に対する選択性を示す。

3. 使用したコントロール抗体としては、以下が挙げられる：1A8 (マウス抗 Flk-1)、Mab 4.6.1 (Genentech 製のマウス抗ヒト VEGF)、およびネガティブコントロールとしての無関係な IgM。

4. NR = 反応が検出されず。

## 【0778】

(3. 2C3 は、非コンフォーメーション依存性エピトープを認識する)

ウエスタンブロット分析は、12D7、2C3および7G3が、還元条件下および非還元条件下で、変性VEGF121およびVEGF165と反応することを示す。従って、これらの抗体は、非コンフォーメーション依存性（non-conformationally-dependent）のエピトープを認識するようである。

#### 【0779】

対照的に、GV39M、11B5および3E7は、ウエスタンブロット上でVEGFと反応しなかった。これはおそらく、それらが、コンフォーメーション依存性であり、そして変性条件下で変形する、VEGFのN末端上のエピトープを認識するからである。

#### 【0780】

抗VEGF抗体のウエスタンブロット分析を、12%ゲル上のSDS-PAGEを使用して、5%FCS存在下でVEGF165を分離して、ECL検出を使用する標準的なウエスタンブロッティングプロトコルによって分析することによって行った。一次抗体を、マルチレーンミニブロッター装置を使用して、ニトロセルロース膜と共にインキュベートした。コントロール抗体としては、以下を含んだ：1  $\mu$ g/mlのAb-3（Oncogene Science製のVEGFに特異的なモノクローナルIgG）、5  $\mu$ g/mlのA-20（Santa Cruz Biotechnology, Inc.製のウサギ抗VEGF抗体）、および10  $\mu$ g/mlの無関係な特異性のIgG。

#### 【0781】

5  $\mu$ g/mlの2C3を含む、異なる抗体についての代表的なウエスタンブロットは、ダイマーのVEGFを約42kdの大きいバンドとして示した。約130kdのマルチマーのVEGFもまた、12D7、7G3およびポジティブコントロール抗体で明らかになった。

#### 【0782】

#### （4．腫瘍免疫組織化学）

免疫組織化学によって試験した腫瘍は、癌患者由来の種々の型のヒト腫瘍、マウス中で増殖された種々の型の移植可能なヒト腫瘍異種移植片、モルモット中で

増殖されたモルモット系統10腫瘍、およびマウス中で増殖されたマウス3LL腫瘍であった（詳細については、表3に対する説明を参照のこと）。

#### 【0783】

NCI-H358ヒトNSCLC異種移植片に対する3E7、GV39Mおよび11B5の免疫組織化学的反応性を測定し、そしてコントロール抗体（無関係な特異性のIgG；A20（ウサギ抗VEGF抗体）；およびMECA 32（ラット抗マウス内皮細胞抗体）と比較した。SCIDマウス中で増殖されたNCI-H358ヒトNSCLCの8  $\mu$ mの凍結切片を、間接的な免疫ペルオキシダーゼ技術を使用して染色し、そしてヘマトキシリンで対比染色した。

#### 【0784】

GV39Mおよび11B5（これらは、VEGF上のエピトープグループ1を認識する）が、試験した全ての腫瘍において、血管内皮細胞を強く染色し、そして血管周囲の結合組織を中程度に染色することが決定された。エピトープグループ1抗体は、腫瘍細胞とのそれらの反応性において異なり、GV39Mは、腫瘍細胞と弱くしか反応しないが、一方、11B5は、より強く反応した。MECA 32（マウス）またはTEC 11（ヒト）によって染色された内皮細胞の約80%は、GV39Mおよび11B5によってもまた染色された。

#### 【0785】

3E7および7G3（これらは、VEGFエピトープグループ2を認識する）は、試験した全ての腫瘍において、血管内皮細胞、結合組織、および腫瘍細胞との反応性を示した（表3）。特に、抗体を低濃度（1～2  $\mu$ g/ml）で適用した場合に、内皮細胞染色の強度は、腫瘍細胞染色または結合組織染色よりも、代表的にはより強く、血管内皮に対する選択性の顕著な増大が見られた。

#### 【0786】

#### 【表8】

表3. 腫瘍切片に対する抗VEGF抗体の  
免疫組織化学的反応性

グループ	抗体	反応性	内皮細胞 染色 異種移植片 (経2の)	ヒト腫瘍 (経2の)	モルモット 腫瘍 (系統10)	マウス 腫瘍 (3LL)
1	GV39M	EC>CT>TC	3-4+	2-3+	4+	3+
1	11B5	EC>CT=TC	3+	3+	3+	3+
2	3E7	EC>CT=TC	2+	2+	2+	1-2+
2	7G3	EC>CT=TC	3+	2-3+	3+	2+
3	12D7	NR	-	-	-	-
4	2C3	NR	-	-	-	-

### 【0787】

免疫組織化学分析を、標準的な免疫組織化学技術によって、腫瘍組織のアセトン固定凍結切片に対して行った。これらの切片を、顕微鏡試験し、そして以下のように反応性についてスコア付けした：-、陰性；+/-、非常に弱い；1+、弱い；2+、中程度；3+、強い；4+、非常に強い。

1. 2C3および12D7を、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ で適用し；全ての他の抗体を、 $5\sim 10\mu\text{g}/\text{ml}$ で適用した。

2. 反応性の定義：EC=内皮；CT=結合組織；TC=腫瘍細胞；NR=反応なし。

3. 試験したヒト腫瘍異種移植片；NCI-H358 NSCLC、NCI-H460 NSCLC、HT29結腸腺癌、L540ホジキンリンパ腫。

4. 試験したヒト腫瘍；軟性組織肉腫、ホジキンリンパ腫、腎臓癌、乳癌、耳下腺癌、結腸癌、肺癌および内皮癌。

5. 系統10モルモット腫瘍切片におけるモルモットVEGFとの反応性。

6. マウス3LL Lewis肺癌腫瘍切片におけるマウスVEGFとの反応性。

## 【0788】

12D7および2C3は、いずれの腫瘍組織の凍結切片を染色しなかった。これはおそらく、組織のアセトン固定が、抗体結合を破壊したからである。しかし、2C3は、インビボ注射後に腫瘍組織に局在化した（以下を参照のこと）。

## 【0789】

GV39M、11B5、3E7および7G3は、モルモット中で増殖されたモルモット系統10腫瘍およびマウス中で増殖されたマウス3LL腫瘍の凍結切片上の齧歯類血管系と反応した。GV39M、11B5および7G3は、ヒト腫瘍標本中のヒト血管系と反応したのと同様に、モルモットおよびマウスの腫瘍血管系と強く反応した。3E7は、モルモットまたはヒトの腫瘍切片を染色するよりも、低い強度でマウス3LL腫瘍を染色した。これは、3E7が、マウスVEGFに対するより低い親和性を有することを示唆する。これらの結果は、2C3を除く全ての抗体が、マウスVEGFと反応することを示す、間接的ELISAによる分析と一致する。

## 【0790】

（実施例II）

（2C3は、内皮細胞移動を阻害する）

（A. 材料および方法）

（内皮細胞増殖アッセイ）

成体ウシ大動脈内皮（ABAE）細胞を、1500細胞／ウェルで96ウェル組織培養プレート内にプレートし、そして種々のサンプルおよびコントロール抗体の添加と共に、0.5nMのヒトVEGFの存在下で増殖させた。コントロールウェルは、VEGFを含むか、または含まない培地を含んだ。

## 【0791】

インキュベーション後4日目で、細胞を、MTC（3-（4,5-ジメチルチアゾール-2-イル）-5-（3-カルボキシメトキシフェニル）-2-（4-スルホフェニル）-2H-テトラゾリウム、内部塩（inner salt））変換アッセイによって定量化した。ここで、ホルマザンへのMTS変換は、細胞数に比例し、そして490nmの吸光度によって追跡され得る（Cell Ti



ter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI)

。このアッセイは、製造業者の説明書に従って行った。

#### 【0792】

細胞増殖を、VEGFを添加しなかった培養物中のMTS変換を差し引くことによって推測した。結果を、VEGFのみが添加されたコントロール培養物中のMTS変換のパーセンテージとして表した(Buttkeら、1993)。

#### 【0793】

(B. 結果)

(VEGF媒介内皮細胞増殖の阻害)

VEGF上のエピトープグループ1～3を認識する、IgG抗体3E7および12D7は、ABAE細胞のVEGF媒介増殖を阻害しなかった(図1)。これは、これらの抗体が、そのエピトープがVEGF:KDR相互作用に関与しない、非遮断(non-blocking)抗VEGF抗体であることを示唆する。VEGF上のエピトープグループ1～3をまた認識する、IgG抗体GV39Mは、同様に、ABAE細胞のVEGF媒介増殖を阻害せず、そして非遮断抗VEGF抗体である。

#### 【0794】

対照的に、VEGF上のエピトープ4に対する2C3、および参照の中和抗VEGF抗体、Mab4.6.1は、それぞれ、3nMおよび1nMで、VEGF媒介ABAE増殖を50%阻害した(図1)。これは、2C3が、VEGFのマイトジェン活性を中和し得ることを示す。

#### 【0795】

2C3の遮断Mabとしての規定は、GV39M、3E7および12D7に加えた、他の抗体の範囲からは、2C3を区別する。種々の抗VEGF抗体(例えば、Ab-3)は、非遮断モノクローナルであることが知られており、これらは、2C3から明確に区別される。

#### 【0796】

IgM抗体の1つである、11B5は、8nMより高い濃度でABAE細胞に

対して毒性であった。30分以内および24時間以内に脱離された細胞は、トリパンブルー色素を取り込んだ。この効果は、細胞型特異的であるようである。なぜなら、H U V E C、ブタ大動脈内皮細胞、およびb E N D. 3細胞は、40 n Mでさえ、11 B 5によって影響されなかったからである。V E G Fの添加の不在下および塩基性線維芽細胞増殖因子（b F G F）の存在下で生じるように、11 B 5の毒性効果は、増殖因子非依存性であるようである。

### 【0797】

（実施例 I I I）

（2 C 3は、インビボで腫瘍に特異的に局在化する）

（A. 材料および方法）

（ヒト腫瘍異種移植片へのインビボ局在化）

腫瘍を、腫瘍体積が約1 c m<sup>3</sup>になるまで、免疫無防備状態マウスにおいて皮下増殖させた（n u / n uマウスにおいてN C I - H 3 5 8 N S C L CおよびS C I DマウスにおいてH T 2 9結腸腺癌）。S C I Dマウスを使用する研究についての100 μ gの非標識抗体、またはヌードマウスを使用する研究についての100 μ gのビオチン化抗体を、尾静脈を介して静脈内注射した。24時間後、マウスを麻酔し、P B Sを灌流し、そして心臓、肺、肝臓、腎臓、腸および脾臓を含む腫瘍および器官を収集し、液体窒素中で瞬間凍結させた。

### 【0798】

各マウス由来の腫瘍および器官を、上記のように、低温槽上で切片化し、そして免疫組織化学的に抗体について染色した。ただし、ヌードマウス由来の切片は、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン-ビオチン複合体（D a k o, C a r p i n t e r i a, C A）を使用して発色させ、そしてS C I Dマウス由来の切片は、2つのペルオキシダーゼ結合体化二次抗体（ヤギ抗マウスI g G + I g M、その後のウサギ抗ヤギI g G）を使用して発色させた。

### 【0799】

（B. 結果）

（腫瘍保有マウスにおけるインビボ局在化）

ヒト腫瘍異種移植片における2 C 3、3 E 7およびG V 3 9 Mのインビボ局在

化を決定した。100  $\mu$ g のビオチン化2C3またはアイソタイプ適合型コントロールIgGを、NCI-H358ヒトNSCLCを保有するnu/nuマウス内にi. v. 注射した。100  $\mu$ g のGV39Mおよび3E7またはアイソタイプ適合型コントロールIgGを、HT29ヒト結腸腺癌を保有するSCIDマウス内に注射した。24時間後、マウスを屠殺し、放血し、そして腫瘍および組織を取り出した。腫瘍および組織の凍結切片を、免疫組織化学的に分析し、抗体の結合および分布を決定した(表4)。

### 【0800】

(表4. 腫瘍を有するマウスにおける抗VEGF抗体の組織分布)

### 【0801】

### 【表9】

抗体	免疫組織化学反応性						
	心臓	肺	肝臓	腎臓 <sup>1</sup>	腸	脾臓	腫瘍 <sup>2</sup>
2C3	-	-	-	-	-	-	3+
3E7	-	-	-	-	-	-	1-2+
GV39M	-	-	-	2+	-	-	2+
コントロール <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-

### 【0802】

免疫組織化学分析を、屠殺の24時間前に静脈内に、100mgの示された抗体を受容した、腫瘍を有するマウス由来の、アセトン固定化した組織(腫瘍を含む)の凍結切片上で実行した。その切片を、顕微鏡的に試験し、そして以下のように特異的反応性について点数付けした：－，ネガティブ；＋／－，非常に弱い；＋，弱い；2＋，中程度；3＋，強い；4＋，非常に強い。

1. GV39Mは、腎臓の糸球体中の内皮または血管間膜細胞に特異的に結合した。

2. 3E7およびGV39Mは、腫瘍血管内皮に特異的に結合したが、一方、2

C 3は腫瘍支質に特異的に結合した。

3. コントロール=無関係の特異性の I g M。

【0803】

3 E 7は、腫瘍中の血管内皮に特異的に局在した。およそ70%のMECA 32ポジティブな血管が、インビボで注射された3 E 7によって染色された。微小脈管構造を与えるより大きな血管は、3 E 7ポジティブであった。小さな微小血管は、支質のトラックおよび腫瘍のネストの両方においてもまた、3 E 7についてポジティブであった。3 E 7による染色の強度は、病巣の壊死の領域においておよびその領域の周辺で増加した。腫瘍の壊死の領域においては、血管外の抗体が明白であるが、腫瘍の健常な領域においては、血管外染色の証拠はほとんどなかった。試験されたすべての正常な組織（腎臓を含む）における血管内皮は、3 E 7によって染色されなかった。

【0804】

GV39Mもまた、腫瘍の血管内皮に特異的に特異的に局在化した。腫瘍中のおよそ80%のMECA 32ポジティブ血管がGV39Mによって染色された。GV39Mポジティブ血管は、腫瘍全体にわたって等しく分布していた（大きな血管を含むが、小さな毛細管もまた含む）。3 E 7と同様に、GV39Mポジティブ血管の染色強度は、腫瘍の病巣の壊死領域において増大した。しかし、3 E 7とは異なり、腎臓の糸球体の内皮細胞または血管間膜細胞もまた染色された。関連性のない特異性のコントロール I g Mは糸球体の染色を生じないから、GV39Mによる糸球体の染色は抗原特異的であるようである。腎臓以外の組織中の血管内皮は、GV39Mによって染色されなかった。

【0805】

ビオチン化された2 C 3は、静脈内注射後のH358ヒトNSCLC腫瘍の脈管構造を取り囲む接合組織の強力な染色を生じた。腫瘍細胞のネストを結合する支質組織の大きなトラックは、支質の最大のトラックで最も強い局在化が観察される、2 C 3によって染色された。これらの領域において、周りを取り囲む結合組織から、血管内皮を区別することは不可能であった。しかし、支質によって取り囲まれない血管中の内皮細胞（例えば、腫瘍組織それ自体のネストを通して走



る血管中の内皮細胞)が染色された。試験されたいかなる正常組織においても、2C3による検出可能な染色は存在しなかった。

#### 【0806】

HT29ヒト腫瘍モデルにおいて、2C3もまた強力に結合組織に局在したが、大部分の強力な染色は、腫瘍の壊死領域中で観察された。

#### 【0807】

##### (実施例IV)

(2C3は、VEGFのVEGFR2に対する結合を阻害するが、VEGFR1に対する結合は阻害しない)

##### (A. 材料と方法)

##### (1. 細胞株および抗体)

VEGFR1 (PAE/FLT) またはVEGFR2 (PAE/KDR) のいずれかでトランスフェクトしたブタ大動脈内皮 (PAE) 細胞は、Dr. Johannes Waltenberger (Ulm, Germany) から入手し、これは、Waltenbergerら (1994、本明細書中で参考として具体的に援用される) に記載されるように調製され、そして5% FCS、L-グルタミン、ペニシリン、およびストレプトマイシン (GPS) を含むF-12培地中で増殖させた。bEND3細胞は、Dr. Werner Risau (Bad Nauheim, Germany) から入手し、そして5% FCSおよびGPSを含むDMEM培地中で増殖させた。NCI-H358 NSCLC (Dr. Adi Gazdar, UT-Southwestern, Dallas, TXから入手した)、A673ヒト横紋筋肉腫、およびHT1080ヒト線維肉腫 (両方ともAmerican Type Culture Collectionより) は、10% FCSおよびGPSを含有するDMEM培地中で増殖させた。

#### 【0808】

2C3および3E7 (抗VEGFモノクローナル抗体)、および1A8 (モノクローナル抗Flk-1抗体)、およびT014 (ポリクローナル抗Flk-1抗体) は、上記のように実施例Iに、ならびにBrekkenら (1998) お

よびHuangら(1998)(各々が具体的に本明細書中に参考として援用される)に記載される。A4.6.1(マウス抗ヒトVEGFモノクローナル抗体)は、Dr. Jin Kim(Genentech Inc., CA)から入手し、そして以前に記載されている(Kimら、1992;具体的に本明細書中に参考として援用される)。使用したネガティブコントロール抗体は、OX7、マウス抗ラットThrl.1抗体(Bukovskyら、1983)(Dr. A. F. Williams(MRC Cellular Immunology Unit, Oxford, UK)より入手)およびC44、マウス抗コルヒチン抗体(Rouanら、1990、ATCCより入手)。

#### 【0809】

##### (2. ELISA分析)

VEGFR1の細胞外ドメイン(Flt-1/Fc、R&D Systems, Minneapolis)またはVEGFR2(sFlk-1-ビオチン)を、それぞれ、マイクロタイタープレートのウェル上で直接コートするか、またはNeutrAvidin(Pierce, Rockford, IL)でコートされたウェルによって捕捉された。1nM(40ng/ml)の濃度のVEGFを、100~1000nM(15μg-150μg/ml)のコントロール抗体または試験抗体の存在下または非存在下でウェル中でインキュベートした。次いで、そのウェルを、1μg/mlのウサギ抗VEGF抗体(A-20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)とともにインキュベートした。

#### 【0810】

反応を、ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗ウサギ抗体(Dako, Carpinteria, CA)の添加によって発色させ、そして3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン(TMB)基質(Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc.)の添加によって可視化した。15分後、1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>で反応を停止させ、そして分光測定的に450nmで読みとりを行った。

#### 【0811】

アッセイをまた、コントロール Ig G および試験 Ig G のいずれかでマイクロタイタープレートのウェルをコートすることによって行った。次いで、ウェルを VEGF : Flt-1/Fc または VEGF : sFlk-1-ビオチンとともにインキュベートし、そして、それぞれ、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト Fc (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc.) またはペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンのいずれかを用いて発色させ、そして上記のように可視化した。

### 【0812】

#### (3. 共沈殿アッセイ)

40 ng の VEGF を、2 C3 (20  $\mu$ g) または A4.6.1 (10 および 1  $\mu$ g) のいずれかの F(ab')<sub>2</sub> とともに 30 分間、結合緩衝液 (1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM CuSO<sub>4</sub>, および 0.5% トリプトンを有する DMEM) 中でブレインキュベートした。200 ng の可溶型 VEGFR1 (Flt-1/Fc) または VEGFR2 (KDR/Fc, R&D Systems, Minneapolis, MN) を 50  $\mu$ l の総容量で添加し、そして 2 時間インキュベーションした。レセプター/Fc 構築物を、プロテイン A-sepharose ビーズを使用して沈殿させ、そして得られた沈殿物を結合緩衝液を用いて 4 回洗浄した。

### 【0813】

還元サンプル緩衝液を、各反応のペレットおよび上清に添加し、両方を 12% SDS-PAGE によって分析し、そして PVDF メンブレンに転写した。次いで、そのメンブレンを、12D7 (1.0  $\mu$ g/ml) (マウス抗 VEGF 抗体) でプロービングし、そしてペルオキシダーゼ標識ヤギマウス IgG (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) とのインキュベーション後に、Super Signal chemiluminescence substrate (Pierce, Rockford, IL) によって発色させた。可溶性レセプター/Fc 構築物もまた、ペルオキシダーゼ結合体化ヤギ抗ヒト Fc (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) を使用して検出した。



## 【0814】

## (B. 結果)

(1. 2C3は、ELISAにおいてVEGFのVEGFR2への結合をブロックするが、VEGFR1への結合はブロックしない)

抗VEGF抗体2C3は、ELISAアッセイにおいて、VEGFがVEGFR2 (KDR/F1k-1) に結合することをブロックするが、VEGFR1 (FLT-1) への結合はブロックしなかった。100倍および1000倍モル過剰の2C3の存在下において、VEGFR2コートされたウェルに結合するVEGFの量は、2C3の非存在下において結合する量の26%および19%にそれぞれ減少した(図2)。対照的に、100倍および1000倍モル過剰の2C3の存在下において、VEGFR1コートされたウェルに結合するVEGFの量は、それぞれ、2C3の非存在下において結合する量の92%および105%であった(図2)。

## 【0815】

VEGFR1またはVEGFR2に結合するVEGFの量は、100~1000倍過剰の非ブロッキングモノクローナル抗VEGF抗体3E7または関連性のない特異性のコントロールIgGの存在によって影響されなかった(図2)。A4.6.1は、VEGFR2 (KDR/F1k-1) とVEGFR1 (FLT-1) の両方へのVEGF結合をブロックした。

## 【0816】

(2. 2C3は、溶液中でVEGFのVEGFR2への結合をブロックするがVEGFR1への結合をブロックしない)

2C3が、溶液中で、VEGFのVEGFR1/FcまたはVEGFR2/Fcへの結合をブロックする能力を、共沈殿アッセイにおいて評価した。40ngのVEGFを、Fc部分 (FLT-1/Fc) に連結したVEGFR1の細胞外ドメインまたは2C3またはA4.6.1 F(ab')<sub>2</sub>の存在下または非存在下で連結したVEGFR2 (KDR/Fc) の200ngとともにインキュベートした。レセプター/Fc構築物を、プロテインA sepharoseビーズを伴うインキュベーションによって沈殿させた。沈殿物を洗浄し、還元サンプル

緩衝液中に再懸濁し、そして12% SDS-PAGEによって分離し、そしてP VDFに転写した。メンブレンをP82でブロックし、そして12D7 ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) マウス抗VEGF抗体でプロービングし、そして標準的な化学発光条件下で発色させた。F(ab')<sub>2</sub>を伴うVEGFモノマーおよびダイマーを検出した。

#### 【0817】

VEGFR1/FcまたはVEGFR2/Fcのいずれかと混合したVEGFを、プロテインA sepharoseによって共沈殿させた。このことは、VEGFが両方のレセプターに結合することを示す。2C3 F(ab')<sub>2</sub>の付加は、VEGFのVEGFR2/Fcへの結合をブロックしたが、VEGFR1/Fcへの結合はブロックしなかった。対照的に、4.6.1 F(ab')<sub>2</sub>は、VEGFのVEGFR2/FcとVEGFR1/Fcの両方への結合をブロックした。この結果は、2C3が、VEGFのVEGFR2への結合を阻害するが、VEGFR1への結合を阻害しないこと、それに対して、4.6.1抗体は、VEGFのVEGFR2とVEGFR1の両方への結合を阻害することを支持する。

#### 【0818】

(実施例V)

(2C3は、VEGFによって誘導されるVEGFR2のリン酸化をブロックする)

(A. 材料および方法)

(免疫沈殿およびウェスタンブロット分析)

PAE/KDR、PAE/FLT、およびbEND. 3細胞を、5%血清を含む培地中の100mm組織ディッシュにおいて、80~90%コンフルエントまで増殖させた。次いで、細胞を、0.1%血清を含む培地中で24時間血清飢餓にした。PBS中の100nM オルトバナジン酸ナトリウムでの30分間の前処理の後に、さらなる15分間のコントロール抗体または試験抗体の存在下または非存在下において、細胞を5nM (200ng/ml) のVEGF165、5nM (100ng/ml) bFGF (R&D Systems, Minneapolis)

olis, MN)、またはA673腫瘍馴化培地とともにインキュベートした。

#### 【0819】

次いで、細胞を、10mM EDTA、2mM フッ化ナトリウムおよび2mM オルトバナジン酸ナトリウムを含有する氷冷したPBSで洗浄し、そして溶解緩衝液(50mM Tris、150mM NaCl、1% Nonidet P-40、0.25% デオキシコール酸、0.1% CHAPS、5mM EDTA、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、2mM フッ化ナトリウム、2mM オルトバナジン酸ナトリウム、10% グリセロール、およびプロテアーゼインヒビター(Complete Protease Inhibitor Cocktail tablets, Boeringer Mannheim)中で溶解させた。この溶解物を遠心分離によって清澄化し、そして得られた上清を免疫沈降のために使用した。

#### 【0820】

VEGFR1およびVEGFR2は、それぞれ、細胞溶解物を5μgのニワトリ抗FLT-1 N末端(Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)または10μgのT014(アフィニティー精製した抗Flk-1)とともに4℃で一晩インキュベートすることによって免疫沈降させた。ニワトリ抗FLT-1抗体を使用する反応は、引き続いて、架橋したヤギ抗ニワトリ抗体(Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc.)とともに4℃で1時間インキュベートした。次いで、この免疫複合体を、プロテインA/G sepharoseを用いて沈殿させ、PBS-Tween(0.2%)中の10%溶解緩衝液(プロテアーゼインヒビターを添加して)複数回洗浄し、そして100mM β-メルカプトエタノールおよび8M 尿素を含有するSDSサンプル緩衝液中で煮沸した。

#### 【0821】

次いで、サンプルをSDS-PAGEによって分離し、そしてPVDFメンブレンに転写した。このメンブレンを、PP81(East Coast Biologics, Berwick, ME)で30~60分間ブロックし、そしてホスホチロシン残基について、0.5μg/mlの4G10(Upstate B

iototechnology, Lake Placid, NY) を用いて、4℃で一晩プロービングした。ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgG (Dako, Carpinteria, CA) とのインキュベーションの後、Super Signal chemiluminescence substrate (Pierce, Rockford, IL) によってPVDFメンブレンを発色させた。次いで、PVDFメンブレンを、ImmunoPure Elution buffer (Pierce, Rockford, IL) で、55℃で30分間ストリップし、そして0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ニワトリ抗FLT-1または1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  T014のいずれかを用いてレセプターレベルについて再プロービングし、そして適切なペルオキシダーゼ結合体化二次抗体とのインキュベーション後に上記のように発色させた。

#### 【0822】

##### (B. 結果)

##### (VEGF誘導されたリン酸化のブロッキング)

これらの研究において、PAE/KDR細胞を、PBS、bFGF (5 nM、100 ng/ml)、VEGF165 (5 nM、210 ng/ml)、A673馴化培地 (CM)、特定の抗体 (CNTL、2C3、3E7、A4.6.1、別々に100 nM、15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を組み合わせたCM、またはT014単独 (100 nM、15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) で15分間刺激した。PAE/FLT細胞をまた、PBS、VEGF165 (5 nM、210 ng/ml)、A673馴化培地 (CM)、特定の抗体 (2C3、3E7、A4.6.1、別々に100 nM、15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を組み合わせたCM、またはT014単独 (100 nM、15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) で15分間刺激した。次いで、この細胞を、溶解緩衝液中でインキュベートし、そしてレセプターを免疫沈降し、還元条件下でSDS-PAGEによって分離し、PVDFメンブレンに転写し、そして4G50 (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (マウス抗ホスホチロシン抗体) を用いてプロービングし、そして標準的な化学発光条件下で発色させた。次いで、メンブレンをストリップし、そして免疫沈降しているIgGを用いて再プロービングして、各レーン中のレセプタータンパク質のレベルを決定した。

## 【0823】

この結果は、2C3がA4.6.1（コントロール中和抗VEGF抗体）とともに、PAE/KDR細胞中におけるVEGFR2のVEGF誘導性のリン酸化をブロックすることを示す。このことは、2C3とA4.6.1の両方がVEGF媒介性の内皮細胞の増殖をブロックすることを実証した以前の実験と一致した（実施例II；Brekkenら、1998）。免疫沈降物中のVEGFR2のウェスタンブロットを、各レーンにおけるVEGFR2タンパク質の量を実証するために行った。3E7（これは、VEGFのNH<sub>2</sub>-末端エピトープを認識する）は、VEGFR2のVEGF誘導されたリン酸化をブロックせず、そして関連性のない特異性のコントロールIgGもブロックしなかった。

## 【0824】

VEGFR1のVEGF誘導されたリン酸化に対する2C3の効果は明らかではない。他の研究者らが示してきたように、PAE/FLT細胞中の、VEGFR1のVEGF誘導性のリン酸化は、VEGFR1の低い内因性のキナーゼ活性におそらく起因して、実証するのが困難である（De Vriesら、1992；Waltenbergerら、1994；Davis-Smythら、1996；Landgrenら、1998）。

## 【0825】

（実施例 VI）

（2C3は、VEGF誘導された透過性を阻害する）

（A. 材料と方法）

（Miles透過性アッセイ）

以下のプロトコルは、Muroharaら（1998；本明細書中で参考として具体的に援用される）によって記載されたものである。手短に言えば、400～450gの雄性IAF無毛モルモット（Charles River, Wilmington, MA）を麻酔し、次いで、耳の静脈を通して、滅菌PBS中の0.5mlの0.5% Evan's blue色素を静脈内注射した。20分後、20ngのVEGFを、コントロール抗体または試験抗体の存在下または非存在下で皮内（i. d.）注射した。皮内注射の30分後に、モルモットの背面

における得られた青色のスポットを写真撮影し、そしてカリパーを用いて測定した。

#### 【0826】

(B. 結果)

(2C3は、VEGF誘導された透過性をブロックする)

VEGF誘導された透過性に対する2C3の効果を研究するために、400～450gのサイズのIAF無毛モルモット(Hartley strain)を麻酔し、次いで、耳の静脈を通して、滅菌PBS中の0.5mlの0.5% Evans' blue色素を静脈内注射した。20分後、25ngのVEGFを、コントロール抗体または試験抗体の存在下または非存在下で皮内(i.d.)注射した。皮内注射の30分後に、モルモットの背面における得られた青色のスポットを写真撮影し、そしてカリパーを用いて測定した。

#### 【0827】

このMiles透過性アッセイを用いて、VEGFがVEGFR2を活性化することをブロックする2C3は、モルモットにおけるVEGF誘導された透過性を阻害することが見出された。この効果は、VEGFよりも10倍モル過剰、100倍モル過剰、または1000倍モル過剰で、2C3を用いて明白であった。VEGFがVEGFR1とVEGFR2の両方を活性化することをブロックするA4.6.1(これは、VEGFがVEGFR1とVEGFR2の両方を活性化することをブロックする)は、10倍モル過剰でVEGF誘導された透過性をブロックした(本研究およびKimら、1992)。VEGF:VEGFR2相互作用をブロックしない3E7およびコントロールIgGもまた、モルモットのMiles透過性アッセイにおいて、VEGF誘導された透過性をブロックしなかった。

#### 【0828】

これらの結果は、VEGFによって媒介される内皮の透過性が、少なくとも部分的には、VEGFR2活性化を通して媒介されることを示唆する。これらの結果は、VEGFR2のチロシンキナーゼ活性がVEGF誘導された透過性のために必要であることを示した、他の研究者の結果と一致する(Muroharaら

、1998; Joukovら、1998; Ogawaら、1998)。

### 【0829】

(実施例V I I)

(2 C 3の抗腫瘍効果)

(A. 材料と方法)

(1. インビトロ腫瘍増殖阻害)

n u / n uマウスを、0日目に、 $1 \times 10^7$  N C I - H 3 5 8 N S C L C細胞または $5 \times 10^6$  A 6 7 3横紋筋肉腫細胞のいずれかを皮下注射した。1日目および引き続いて1週間あたり2回、マウスに2 C 3の腹腔内注射(示されるように、1、10、もしくは100  $\mu$  gまたはコントロール)を与えた。次いで、腫瘍を、N C I - H 3 5 8保有マウスについては約6週間、およびA 6 7 3保有マウスについては4週間の期間にわたって1週間あたり2回測定した。腫瘍の体積を、式：体積 =  $L \times W \times H$  (ここで、 $L$  = 長さ、 $W$  = 幅、 $H$  = 高さ)に従って測定した。

### 【0830】

(2. インビボ腫瘍治療)

200 ~ 400 mm<sup>3</sup>のサイズの皮下N C I - H 3 5 8腫瘍またはH T 1 0 8 0線維肉腫を有する雄性n u / n uマウスに、試験抗体またはコントロール抗体を腹腔内注射した。N C I - H 3 5 8を有するマウスを、最初の週の間は1週間に3回、そして2週目および3週目の間は1週間に2回、注射1回あたり100  $\mu$  gの抗体で処理した。次いで、このマウスに、5日間毎日、注射1回あたり50  $\mu$  gに切り換えた。H T 1 0 8 0保有マウスを、研究の全期間にわたって1日おきに、100  $\mu$  gの示された抗体、または生理食塩水で処理した。両方の研究において、マウスを、その腫瘍が2500 mm<sup>3</sup>のサイズに達した場合に、または腫瘍が潰瘍を作り始めた場合にはより初期に、屠殺した。

### 【0831】

(B. 結果)

(1. 新規の移植したヒト腫瘍異種移植片の2 C 3増殖阻害)

2 C 3は、用量依存様式でn u / n uマウスにおけるN C I - H 3 5 8 N S

C L CおよびA 6 7 3横紋筋肉腫の両方のインビボ増殖を阻害する（図3 Aおよび図3 B）。腫瘍細胞を皮下に注入したマウスに1週あたり2回 i . p . で与えられた100  $\mu$  gの2 C 3は、両方のヒト腫瘍型の増殖を1日早く阻害した。2 C 3レシピエントにおける最終腫瘍容積は、コントロールのレシピエントにおける約1000 mm<sup>3</sup>と比較すると両方の腫瘍系において約150 mm<sup>3</sup>だった。

#### 【0832】

1週間あたり2度の10  $\mu$  gまたは1  $\mu$  gのいずれかの2 C 3での処置は、腫瘍増殖を防止するのにあまり有効ではなかった。しかし、両方のより低い用量の2 C 3は、未処置マウスと比較して、類似する程度でA 6 7 3腫瘍の増殖を遅らせた。10  $\mu$  gの用量の2 C 3により引き起こされる腫瘍増殖遅延は、N C I - H 3 5 8腫瘍モデルにおいてあまり顕著ではなかった。これらの2つの腫瘍モデルの間の差異および2 C 3によるV E G F R 2活性の阻害に対するこれらの応答は、インビボでの2つの型の腫瘍の攻撃性と関係する。N C I - H 3 5 8は、A 6 7 3が増殖するよりもさらにより遅くインビボで増殖し、そして低用量の2 C 3に対してあまり敏感ではないようであり、一方、A 6 7 3腫瘍は、低用量の2 C 3に対して、より速くかつ攻撃的に増殖しであり、そしてより敏感であるようである。

#### 【0833】

3 E 7（これは、V E G Fに結合するが、その活性をブロックしない）は、N C I - H 3 5 8腫瘍の増殖に影響しなかった。しかし、1週間あたり2回、100  $\mu$  gの用量で与えた3 E 7は、A 6 7 3腫瘍の増殖を刺激した（図3 B）。このことは、それが腫瘍におけるV E G Fシグナル伝達の効果を増大させることを示唆する。

#### 【0834】

（2. 2 C 3を用いる確立したヒト腫瘍異種移植片の処置）

約300～450 mm<sup>3</sup>の大きさまで増殖した皮下N C I - H 3 5 8 N S C L C腫瘍を有するマウスに、無関係の特異性の2 C 3、A 4 . 6 . 1、3 E 7、またはI g Gをi . p . 注射した（図4）。用量は、3～5日ごとに50～100  $\mu$  gであった。A 6 . 4 . 1を陽性コントロールとして用いた。なぜならば、



それは腫瘍増殖の阻害をインビトロで生じるVEGF活性をブロックすることが、他の研究者により示されているからである(Kimら、1993; Mesianoら、1998)。平均腫瘍容積を測定すること(図4)に加えて、各処置群からのマウスの写真をまた、研究の終了時の腫瘍の大きさにおける差異および外見を示すために撮影した。

#### 【0835】

2C3またはA4.6.1のいずれかでの処置は、研究の期間にわたり腫瘍の緩徐な後退を導いた。研究の終了時での平均腫瘍容積は、開始平均腫瘍容積の30%(2C3)および35%(4.6.1)だった(図4)。しかし、これらの結果は、腫瘍増殖における自発的な後退が腫瘍細胞の注射の後の40日～60日の間にマウスのコントロール群において観察されたという事実により複雑化される。40日までの結果は、増殖における自発的な後退の前に、2C3およびA4.6.1での処置が腫瘍増殖を防ぐことを示す。

#### 【0836】

図5Aは、NCI H358を保有するマウスを、100 $\mu$ gの2C3または3E7のいずれかで長期間処置したさらなる研究を示す。この研究では、自発的な後退は、あまり明白ではなかった。処置の開始時点での2C3処置したマウスの平均腫瘍容積は、480mm<sup>3</sup>であり、そして処置のおよそ14週間後の平均腫瘍容積は84mm<sup>3</sup>まで低下した(容積で約80%の低下)。3E7処置したマウスは、428mm<sup>3</sup>の平均腫瘍容積で処置開始し、そしておよそ14週間後に1326mm<sup>3</sup>の容積まで増大した(容積で300%の増加)。

#### 【0837】

図5Bは、ヒト線維肉腫であるHT1080を有するマウスの腫瘍増殖曲線を示す。このマウスを、2日ごとに100 $\mu$ gの2C3、3E7、またはコントロールIgG、あるいは生理食塩水でいずれも処置した。処置と同じくらい長い間、腫瘍の増殖を妨害した2C3を続けた。3E7、コントロールIgG、または生理食塩水で処置したマウスは、進行的にかつ腫瘍細胞注射後の4週間未満で屠殺されるべきマウスに必要とされる大きさまで増殖した腫瘍を有した。

#### 【0838】

(実施例VIII)

(2C3はA4.6.1と区別される)

2C3とA4.6.1との間に多数の差異が存在する(例えば、表5)。抗体は、ELISA交叉ブロック(cross-block)研究(実施例I)に基づいて、VEGF上の別々のエピトープを認識する。変異研究およびX線結晶研究は、A4.6.1が、アミノ酸89~94の周囲に集中するVEGF上のエピトープに結合することを早い時期に示した(Mullerら、1998)。

#### 【0839】

とくに興味深いことは、A4.6.1が、VEGFR1およびVEGFR2の両方への結合からVEGFをブロックする(Kimら、1992; Wiesmannら、1997; Mullerら、1998; Keyら、1986)が、2C3はVEGFR2への結合からのみ、VEGFをブロックする(実施例IV)という事実である。A4.6.1がVEGFR2およびVEGFR1へのVEGF結合を阻害するという強力な公開された証拠は、詳細な結晶研究および構造研究から得た(Kimら、1992; Wiesmannら、1997; Mullerら、1998; Keytら、1996; 各々が本明細書中で参考として援用される)。公開されたデータは、A4.6.1が、VEGFR2への結合のために重要であるVEGFR上のエピトープと競合させることにより、VEGFR2へのVEGF結合を阻害し、そしてVEGFR1へのVEGFの結合を最も好ましくは立体障害によりブロックする(Mullerら、1998; Keytら、1996)。

#### 【0840】

A4.6.1のヒト化バージョンは、現在臨床試験中である(Brem, 1998; Bacaら、1997; Prestaら、1997; 各々が本明細書中で参考として援用される)。マクロファージ/単球の走化性、およびVEGFR1を介して媒介されるVEGFの他の内因性機能は、A4.6.1トライアルにおいて最も損なわれるようである。対照的に、2C3は、VEGFR2媒介効果の特異的にブロックするその能力に起因して、より優れていると予見される。従って、2C3は、特にヒトに対する長期の投与について潜在的により安全な抗体で

ある。2C3を用いる処置の利益は、それがVEGF誘導腫瘍脈管構造拡大をブロックすると同時に、腫瘍へのマクロファージの移動を可能にすることによって、より大きな抗腫瘍応答を開始する宿主の能力を含む。また、マクロファージ走化性およびVEGFR1により媒介される他の効果を維持する多くの全身性の利益を、見逃すべきではない。

# 【0841】

## 【表10】

表5.

抗VEGF抗体2C3およびA4.6.1の特徴

特徴	2C3	A4.6.1
イソ型	IgG2a, k	IgG1 <sup>1</sup>
VEGF上のエピトープ	未決定だが、A4.6.1と区別される <sup>2</sup>	連続性のアミノ酸89～94の周りに集中した
アフィニティー	$1 \times 10^{-9}$ (M) <sup>3</sup>	$8 \times 10^{-10}$ (M)
VEGFR1への結合からVEGFをブロックする	いいえ	はい
VEGFR2への結合からVEGFをブロックする	はい	はい
VEGF誘導透過性をブロックする	はい	はい
VEGF誘導増殖をブロックする	はい	はい
凍結腫瘍切片上で指向するIHCパターン	NR	いくつかのBVと弱い反応性 <sup>4</sup>
インビボ腫瘍局在化パターン	CTと中程度～強力な反応性	少数のBVと中程度の反応性、CTと弱い反応性～無反応性
インビボ腫瘍局在化パターン	検知できない	検知できない

# 【0842】

用いられる略号：IHC、免疫組織化学；NR、無反応性；BV、血管；CT、結合組織。

1. A4. 6. 1 データに関する参考文献としては、以下が挙げられる：Kimら、1992；Wiesmannら、1997；Mullerら、1998；およびKeytら、1996、各々が本明細書中で参考として援用される
2. 2C3がVEGF上で認識するエピトープは未決定だが、A4. 6. 1がELISA交叉ブロック研究を介して認識するエピトープと区別されることが示されている
3. VEGFについての2C3のアフィニティーは、ELISAおよび表面プラスモン共鳴分析により評価されている
4. A4. 6. 1は、わずかに固定した（lightly fixed）アセトン固定凍結切片とのみ反応する

（実施例IX）

（関節組織におけるVEGF染色）

新脈管形成と疾患との間の関係は、血管新生腫瘍において観察される関係を越える範囲におよぶ。例えば、異常な新脈管形成の関与は、関節炎において十分に記載されている。チミジンホスホリラーゼに対する異なる抗VEGF抗体のパネルは、関節炎組織を染色する、および一致するコントロールからのこれを分化させるために用いられている。VEGFに対する抗体を用いる研究は、慢性関節リウマチのパンヌスにおいて著しい発現を示した。

【0843】

（実施例X）

（2C3-エンドスタチン結合体）

（A. エンドスタチンのクローニングおよび発現）

RNAをマウス肝臓から単離し、そして以下のプライマーを用いるRT-PCR<sup>TM</sup> についてのテンプレートとして用いられる：

【0844】

【化2】

5' プライマー-aga cca tgg gtc ata ctc atc agg act ttc a (SEQ ID NO:43);

3' プライマー-ctac cat ggc tat ttg gag aaa gag gtc a (SEQ ID NO:44).

#### 【0845】

得られたcDNAフラグメントは、配列番号12のDNA配列を有し、そして配列番号13のアミノ酸配列を有する。参考のため、ヒトエンドスタチンアミノ酸配列は、配列14である。マウスcDNAフラグメントを発現ベクターH6pQE60 (Qiagen) (これは、N末端6×ヒスチジンタグをコードする) へとクローニングし、次いでE. coli M15細胞中で発現させた。E. coli細胞密度が560nMで0.6の光学密度に達した時に、0.1mMのイソプロピルチオガラクトシド (IPTG) を加え、4時間、6-Hisエンドスタチンの発現を誘導した。細胞を遠心分離により収集し、そして溶解緩衝液 (B-PER Bacterial Protein Extraction Reagent (Pierce, Rockford, IL)) において溶解した。

#### 【0846】

封入体 (6-Hisタグエンドスタチンを含む) を、遠心分離により沈降させ、そして緩衝液A (pH8.0、6MグアニジンHCl (GuHCl)、100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10mM Tris、10mM イミダゾール、10mM β-2メルカプトエタノール) に溶解させた。還元した6-Hisエンドスタチンを含む溶液を過剰の5, 5'-ジチオオービス-2-ニトロ安息香酸 (Ellman's 試薬) (20mM) で処理し、そしてNi-NTAカラムにロードした。このカラムを洗浄緩衝液 (6M GuHCl、100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10mM Tris、500mM NaCl、pH7.3) で洗浄し、そして6-Hisエンドスタチンを洗浄緩衝液中の0.2Mイミダゾールを用いて、カラムから溶出させた。

#### 【0847】

溶出しかつ不溶性の6-Hisエンドスタチンを、等量の再折畳み緩衝液 (r

efolding buffer) (3M尿素、1M Tris pH7.3、0.5M L-アルギニン、0.5M NaCl、0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1mM 還元グルタチオン (GSH)) で希釈し、そして室温で一晩インキュベートした。再折畳みした6-Hisエンドスタチンを、PBS、pH7.4に対して室温で十分に透析した。得られたタンパク質である6-Hisエンドスタチンは、可溶性であり、かつ非還元条件下でのSDS-PAGE分析 (ここで、6-Hisエンドスタチンは単一の20kDaのバンドとして泳動される) に基づいて非常に純粋であった。

#### 【0848】

##### (B. エンドスタチンの機能的活性)

発現されたタンパク質が完全に溶解性であるという事実に加えて、E. coli 発現した6-Hisエンドスタチンが生物学的に活性であるという他の証拠としては、内皮細胞に対して実証された結合が挙げられる。ビオチニル化6-Hisエンドスタチンを調製し、そしてインビトロで3つの異なる内皮細胞型 (Bend3マウス内皮細胞; ABAE、ウシ大動脈内皮細胞; およびHUVEC、ヒト臍帯内皮細胞) とインキュベートした。結合をオ-フェニレンジアミン (OPD) と組み合わせたストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ、および490nmで読んだ吸光度を用いて検出した。

#### 【0849】

直接的結合研究は、(ビオチニル化6-His) エンドスタチンが、インビトロで3つの異なる型の内皮細胞に対して、過飽和な様式で、結合することを示した。また、発現したエンドスタチン (標識なし) は、Bend3内皮細胞に対する結合について、ビオチニル化エンドスタチンと競合することが示された。

#### 【0850】

(C. SMPTおよび2-ITを介する2C3に対するエンドスタチンの結合)

N'-N-ジメチルホルムアミド (DMF) における4-スクシンイミジルオキシカルボニル- $\alpha$ -メチル- $\alpha$ -(2-ピリジルジチオ)-トリエン (SMPT) を、2C3 IgGへ、5:1 (SMPT:2C3) のモル比で添加し、そし

て5mM EDTAを有するPBS (PBSE) 中で、室温 (RT) にて1時間インキュベートした。遊離のSMP Tを、PBSEで行うG25サイズ排除クロマトグラフィーにより取り除いた。同時に、マウス6-Hisエンドスタチンを、2-イミノチオラン (2-IT、Traut's試薬) と、1:5 (エンドスタチン:2-IT) のモル比で、RTにて1時間インキュベートした。遊離の2-ITを、PBSEで行うサイズ排除クロマトグラフィーにより取り除いた。

#### 【0851】

SMP T修飾2C3を、2-IT-修飾6-Hisエンドスタチンと混合し、3~5mlまで濃縮し、そして穏やかな振盪でRTにて24時間インキュベートした。反応物をSDS-PAGEで分析した。非結合体化2C3-SMP Tを、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーにより結合体から取り除き、2C3-エンドスタチンを得る。

#### 【0852】

(D. SMCCおよびSATAを介する2C3へのエンドスタチンの結合)

N-スクシンイミジルS-アセチルチオアセテート (SATA) を、6-His-エンドスタチンと、6:1 (SATA:エンドスタチン) のモル比で室温にて30分間インキュベートした。遊離のSATAを、PBSEで行うG25サイズ排除クロマトグラフィーにより取り除いた。PBSE中のSATA修飾6-Hisエンドスタチンを、4.0mlまで濃縮し、そして0.4ml脱アセチル化溶液 (0.1Mヒドロキシルアミン) を添加した。混合物を室温にて2時間インキュベートした。同時に、PBSE中の2C3-IgGを、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサノ-1-カルボキシレート (SMCC) と共に、1:5 (2C3:SMCC) のモル比にてインキュベートした。遊離のSMCCを、PBSEで行うG25サイズ排除クロマトグラフィーにより取り除いた。

#### 【0853】

次いで、脱アセチル化SATA修飾エンドスタチンを、SMCC修飾2C3とインキュベートし、約5mg/mlの総タンパク質まで窒素気流下で濃縮し、そして穏やかな攪拌でRTにて一晩インキュベートした。反応物をSDS-PAGE

Eで分析した。非結合体化2C3-MCCを、2C3-エンドスタチン結合体から、PBSE中のヘパリンアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより取り除き、2C3-エンドスタチンを得る。首尾良い結合体化はまた、チオール化剤として、SATAよりはむしろ2-イミノチオランを用いて達成された。

#### 【0854】

(E. 2C3およびエンドスタチンの融合タンパク質)

マウスおよびヒトのエンドスタチン、ならびに2C3についてのDNA配列が利用可な（および本明細書中で提供される）場合、2C3-エンドスタチン融合タンパク質を容易に調製可能であり得る。エンドスタチンの発現および再折り畳みは、上述されるように、この分子の首尾良い組換え発現が実際に可能であることを示す。

#### 【0855】

2C3-エンドスタチン融合タンパク質の調製は、エンドスタチンが2C3の重鎖のC末端に存在するか、または2C3ScFvフラグメントに連結される形態であり得る。これらの場合において、組換え技術は、直接的に、連結を変化させ、そして2つの機能的部分を結合するための選択的に切断可能な配列の使用が特に考えられる。プラスミン切断可能配列またはMMP切断可能配列が、現在好ましい。

#### 【0856】

選択的に切断可能な配列の有効性および組換え技術の適応性もまた、2C3-エンドスタチン融合タンパク質（ここで、エンドスタチンが2C3構築物の別の部分で置換される）に提供する。エンドスタチンを、選択的に切断可能な配列（この部位で、機能的エンドスタチンが融合タンパク質から放出される）に作用する酵素と接触させるまで、2C3内に包埋する。

#### 【0857】

(実施例XI)

(2C3-Ang-2結合体)

(A. Ang-2の発現)

2C3-Ang-2結合体を構築するため、Ang-2を、バキュロウイルス発



現系を用いて昆虫細胞で産生し得る場合、好ましくは、組換え形態で使用する。

Ang-2発現および精製のために現在好ましいプロトコルは、Ang-2 cDNAをマウス胎盤RNAからRT-PCR<sup>™</sup>によりクローニングし、そしてAng-2 cDNAをpFastBac1発現ベクターへとクローニングすることに関する。コンピテントDH10Bac E. coli細胞を、組換えプラスミドを用いて形質転換する。

#### 【0858】

抗生物質選択後、組換えBacmidを含むE. coliコロニーを選び、増殖させ、そして組換えBacmid DNAを精製する。昆虫細胞SF9をCellfect試薬を用い、組換えBacmid DNAを用いてトランスフェクトさせる。組換えバキュロウイルスを、トランスフェクトしたSF9細胞の上清から収集する。組換えバキュロウイルスを増幅し、これを用いてSF9細胞を感染させ、そして感染したSF9細胞はAng-2を発現する。Ang-2を、このような感染したSF9細胞の上清からアフィニティー精製により精製した。

#### 【0859】

(B. 2C3へのAng-2の結合)

精製した2C3を、一般的に上記されるように、化学リンカーSMPTを用いて組換えAng-2へ結合させた。N'-N-ジメチルホルムアミド(DMF)中のSMPTを2C3 IgGへ、5:1(SMPT:2C3)のモル比で添加し、そして5mM EDTAを有するPBS中で室温(RT)にて1時間インキュベートする。遊離のSMPTを、PBSEで行うG25サイズ排除クロマトグラフィーにより取り除いた。同時に、組換えAng-2を2-ITと室温にてインキュベートする。遊離の2-ITを、PBSEで行うG25サイズ排除クロマトグラフィーにより取り除いた。

#### 【0860】

SMPT修飾2C3を、2-IT修飾組換えAng-2と混合し、濃縮し、穏やかな振盪で24時間インキュベートする。反応物をSDS-PAGEで分析する。非結合体2C3-SMPTを、結合体からゲル濾過クロマトグラフィーにより取り除き、2C3エンドスタチンを得る。

## 【0861】

## (実施例XII)

## (2C3-組織因子結合体)

2C3を、上記の実施例に記載のようにSMP Tで修飾した。遊離のSMP T SMP Tを、ピーク(2C3-SMP T)を窒素気流下で収集したことを除いて、上記に概説するように、G25クロマトグラフィーにより取り除いた。600  $\mu$  lの2C3-SMP Tを、50mMまでのジチオスレイトール(DTT)の添加の後に、チオピリジン基を定量するために取り除いた。平均3つのMPT基を、1つのIgGあたり導入した。N末端に導入したシステイン残基を有するヒト短縮型組織因子(tTF)を、5mMの $\beta$ 2-MEで還元した。 $\beta$ 2-MEを、G25クロマトグラフィーにより取り除いた。

## 【0862】

還元したN-Cys-tTFを、2C3-SMP Tと共にプールし、そして2.5:1(tTF:IgG)のモル比でRTにて24時間インキュベートした。反応物を50,000の分子量カットオフ(MWCO)メンブランを有するAmiconを用いて1~2mlまで濃縮した。非結合体化tTFおよびIgGを、結合体から、Superdex200サイズ排除クロマトグラフィーを用いて取り除き、2C3-tTFを得た。

## 【0863】

## (実施例XIII)

## (2C3-CRM107結合体)

2C3をSMP Tで修飾した。細胞傷害性薬剤CRM107(Jerry Fulton博士、Inland Laboratories, DeSoto, TX)を、上記の実施例に記載のように、2-ITで修飾した。SMP T修飾2C3を、2-IT修飾CRM107と、1:5(IgG:CRM107)のモル比で、穏やかな振盪でRTにて24時間インキュベートした。結合体化2C3を、遊離の反応物から、Superdex200サイズ排除クロマトグラフィーを用いて取り除き、2C3-CRM107を得た。

## 【0864】

## (実施例XIV)

## (2C3プロドラッグ研究)

(A.  $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) のクローニングおよび発現)

E. coli GUS 遺伝子を含むプラスミド (pBacgus-1) を Novagen, Inc. から得た。プラスミドを H6pQE60 発現ベクターへ GUS 遺伝子 (これは、N 末端 6 × ヒスチジンタグをコードする) をクローニングするための PCR のテンプレートとして用いた。プラスミドを保有する E. coli M15 細胞を、細胞密度が 560 nM にて 0.6 の光学密度に達するまで増殖させた。0.1 mM のイソプロピルチオガラクトシド (IPTG) を添加して、6 his GUS の発現を誘導した。4 時間後、細胞を遠心分離により収集した。

## 【0865】

E. coli ペレットを、細胞溶解緩衝液 (B-PER Bacterial Protein Extraction Reagent (Pierce, Rockford, IL)) 中で溶解した。溶液を、Ni-NTA カラムにロードし、このカラムを洗浄緩衝液 (6M GuHCl、100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10mM Tris、500mM NaCl、pH7.3) で洗浄し、そして結合した 6-His GUS を同じ緩衝液中の 0.2M イミダゾールを用いて、カラムから溶出させた。

## 【0866】

6-His GUS は、SDS-PAGE に基づいて純粋であり、6-His GUS は、75 kDa のバンドの単一バンドとして泳動した。ゲル濾過カラムにおいて、6-His GUS は、約 300 kDa のテトラマーとして泳動する。6-His GUS は、基質である p-ニトロフェニル- $\beta$ -D-グルクロニド (PNPG) を切断するその能力により判断される場合、酵素学的に活性である。

## 【0867】

(B.  $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) への 2C3 の結合)

N-スクシンイミジル S-アセチルチオアセテート (SATA) を、GUS と

、6：1（SATA：GUS）のモル比で室温にて30分間インキュベートした。遊離のSATAを、PBSEで行うG25サイズ排除クロマトグラフィーにより取り除いた。PBSE中のSATA修飾GUSを、4.0mlまで濃縮し、そして0.4ml脱アセチル化溶液（0.1Mヒドロキシルアミン）を添加した。混合物をRTにて2時間インキュベートした。同時に、PBSE中の2C3-IgGを、スクシンイミジル-4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサノール-1-カルボキシレート（SMCC）と共に、1：5（2C3：SMCC）のモル比にてインキュベートした。遊離のSMCCを、PBSEで行うG25サイズ排除クロマトグラフィーにより取り除いた。

#### 【0868】

次いで、脱アセチル化SATA修飾GUSを、SMCC修飾2C3と、穏やかな攪拌でRTにて一晩インキュベートした。遊離のGUSを、遊離の2C3と共にQ-Sepharoseのイオン交換クロマトグラフィーにより取り除き、そして2C3-GUS結合体を、PBS中の0.5M NaClにより溶出した。得られた溶液を、Superdex200サイズ排除クロマトグラフィーにより分離し、2C3-GUSを90%の純度で得た。

#### 【0869】

（C. 2C3-GUS結合体の生物学的活性）

2C3-GUS結合体の各成分の生物学的活性を確認した。2C3-GUSは、2次HRP標識抗マウスIgGおよびOPDにより検出されるように、適切に制御されたELISAにおけるVEGF被覆ウェルに特異的に結合する。最大半減の結合を0.1nMで観察した。従って、2C3結合部分は正確に機能する。GUS部分はまた酵素活性を保持した。

#### 【0870】

2C3-GUSを、 $5 \times 10^6$  cpm/ $\mu$ gの比活性まで、 $^{125}$ Iで放射ヨウ素標識した。マウスへの静脈内注射後、放射性ヨウ素標識した2C3-GUSは、6時間のt1/2 $\alpha$ および25時間のt1/2 $\beta$ で血液から一掃した。

#### 【0871】

（D. GUS切断プロドラッグ）

$\beta$ -グルクロニドプロドラッグ（例えば、ドクソルビシン- $\beta$ -グルクロニドおよびカルシミシン- $\beta$ -グルクロニド）を、米国特許第5,561,119号（本明細書中で参考として援用される）に記載のように、基本的に調製した。このようなプロドラッグを、グルコシド酵素（例えば、GUS）により消化される場合のみに、細胞傷害性成分（例えば、ドクソルビシンまたはカルシミシン）を放出するように設計する。2C3にGUSを付着させることにより、GUSは、腫瘍脈管構造および支質を特異的に標的化し、プロドラッグの特異的切断、および腫瘍部位内の特定の細胞毒性成分の放出を提供する。

#### 【0872】

（E. 2C3-GUS結合体の生物学的活性）

2C3-GUSは、皮下部位にヒトNCI-H358 NSCLC腫瘍を保有するSCIDマウスへのi.v.注射の後、腫瘍脈管構造および腫瘍支質の周辺に特異的に局在化する。2C3-GUSの存在を、HRP標識抗マウスIgGまたはHRP標識抗GUSを用いて、腫瘍の凍結切片において免疫組織化学的に検出した。最大局在を、2C3-GUSの注射の24～48時間後に観察した。正常な組織は染色されなかった。腫瘍脈管構造および腫瘍支質周辺への2C3-GUSの特異的な局在は、全身投与されるプロドラッグ（例えば、ドクソルビシングルクロニドまたはカルシミシングルクロニド）を腫瘍内でのみ活性化させる。

#### 【0873】

本明細書中に記載されるようなハイブリドーマ細胞株を、ブタペスト条約の規定の下に、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC）、Manassas, VA, USAに寄託し；そして受託番号ATCC番号PTA 1595を割り当てられた。本明細書中に記載されかつ特許請求される本発明は、寄託されたPTA 1595細胞株により範囲を限定されない。なぜならば、寄託された実施形態は、本発明の1つの局面を例示し、等価なモノクローナル抗体を機能的に産生する等価なハイブリドーマ細胞株は、本発明の範囲内に含まれるからである。実際に、本明細書中に記載されかつ特許請求される全ての組成物および方法は、本開示を考慮して、過度の実験なしになされかつ完成され得る。

## 【0874】

本発明の組成物および方法は、好ましい実施態様の項で記載されているが、本明細書中に記載される組成物および方法ならびに本発明の方法の工程または一連の工程に、本発明の概念、思想および範囲を逸脱せずに、改変が適用され得ることは当業者には明らかである。より詳細には、化学的および生理学的の両方に関連する特定の試薬が本明細書中に記載される薬剤と置き換えられ得るが、同じまたは類似の結果が達成されることが明らかである。当業者には明らかである全てのこのような類似の置き換えおよび改変は、添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の思想、範囲および概念内にあるとみなされる。

## 【0875】

## (参考文献)

以下の参考文献は、本明細書中の記載を補充する例示的な手順またはほかの詳細を提供する程度まで、本明細書中に参考として詳細に援用される。

## 【0876】

## 【表11】

- Abrams and Oldham, In: *Monoclonal Antibody Therapy of Human Cancer*, Foon and Morgan (Eds.), Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp. 103-120, 1985.
- Aiello, Pierce, Foley, Takagi, Chen, Riddle, Ferrara, King, Smith, "Suppression of retinal neovascularization *in vivo* by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:10457-10461, 1995.
- Akuzawa, Kurabayashi, Ohyama, Arai, Nagai, "Zinc finger transcription factor Egr-1 activates Flt-1 gene expression in THP-1 cells on induction for macrophage differentiation", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(2):377-84, 2000.
- Alon, Hemo, Itin, Pe'er, Stone, Keshet, "Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity," *Nature Med.*, 1:1024-1028, 1995.
- Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- Anthony, Wheeler, Elcock, Pickett, Thomas, "Short report: identification of a specific pattern of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human placenta and cultured placental fibroblasts", *Placenta*, 15:557-61, 1994.
- Asahara *et al.*, "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis," *Science*, 275(5302):964-967, 1997.
- Asahara, Chen, Takahashi, Fujikawa, Kearney, Magner, Yancopoulos, Isner, "Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization" *Circ. Res.*, 83(3):233-40, 1998.
- Asano, Yukita, Matsumoto, Kondo, Suzuki, "Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor," *Cancer Res.*, 55:5296-5301, 1995.
- Asano, Yukita, Matsumoto, Hanatani, Suzuki, "An anti-human VEGF monoclonal antibody, MV833, that exhibits potent anti-tumor activity *in vivo*," *Hybridoma*, 17:185-90, 1998.
- Baca *et al.*, "Antibody humanization using monovalent phage display," *J. Biol. Chem.*, 272(16):10678-84, 1997.

(参考文献の続き)

- Barbas, Kang, Lerner and Benkovic, "Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(18):7978-7982, 1991.
- Baxter and Jain, "Transport of fluid and macromolecules in tumors," *Micro. Res.*, 41:5-23, 1991.
- Benjamin, Golijanin, Itin, Pode and Keshet, "Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal," *J. Clin. Invest.*, 103(2):159-165, 1999.
- Berman, Mellis, Pollock, Smith, Suh, Heinke, Kowal, Surti, Chess, Cantor, *et al.*, "Content and organization of the human Ig VH locus: definition of three new VH families and linkage to the Ig CH locus," *EMBO J.*, 7(3):727-738, 1988.
- Borgstrom, Hillan, Sriramaraio, Ferrara, "Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy," *Cancer Res.*, 56(17):4032-4039, 1996.
- Borgstrom, Bourdon, Hillan, Sriramaraio, Ferrara, "Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors *in vivo*," *Prostate*, 35(1):1-10, 1998.
- Borgstrom, Gold, Hillan, Ferrara, "Importance of VEGF for breast cancer angiogenesis *in vivo*: implications from intravital microscopy of combination treatments with an anti-VEGF neutralizing monoclonal antibody and doxorubicin," *Anticancer Research*, 19(5B):4203-11, 1999.
- Bornstein, "Thrombospondins: structure and regulation of expression," *FASEB J*, 6(14):3290-3299, 1992.
- Borrebaeck and Moller, "*In vitro* immunization. Effect of growth and differentiation factors on antigen-specific B cell activation and production of monoclonal antibodies to autologous antigens and weak immunogens," *J. Immunol.*, 136(10):3710-3715, 1986.
- Brekken, Huang, King, Thorpe, "Vascular endothelial growth factor as a marker of tumor endothelium," *Cancer Res.*, 58(9):1952-1959, 1998.
- Brem, "Angiogenesis antagonists: current clinical trials," *Angiogenesis*, 2: 9-20, 1998.
- Bukovsky, Presl, Zidovsky, Mancal, "The localization of Thy-1.1, MRC OX 2 and Ia antigens in the rat ovary and fallopian tube," *Immunology*, 48(3):587-596, 1983.
- Burke *et al.*, "Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors," *Science*, 236, 806-812, 1987.
- Burke, Lehmann-Bruinsma, Powell, "Vascular endothelial growth factor causes endothelial proliferation after vascular injury," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 207:348-354, 1995.



(参考文献の続き)

- Burrows and Thorpe, "Vascular targeting-a new approach to the therapy of solid tumors," *Pharmacol. Ther.*, 64:155-174, 1994a.
- Burrows and Thorpe, "Eradication of large solid tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:8996-9000, 1994b.
- Burrows, Watanabe, Thorpe, "A murine model for antibody-directed targeting of vascular endothelial cells in solid tumors," *Cancer Res.*, 52:5954-5962, 1992.
- Burrows, Derbyshire, Tazzari, Amlot, Gazdar, King, Letarte, Vitetta, Thorpe, "Endoglin is an endothelial cell proliferation marker that is upregulated in tumor vasculature," *Clin. Cancer Res.*, 1:1623-1634, 1995.
- Buttke, McCabrey, Owen, *J. Immunol. Methods*, 157:233-240, 1993.
- Campbell, In: *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Burden and Von Knippenberg (Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 75-83, 1984.
- Carmeliet, Ferreira, Breier, Pollefeyt, Kieckens, Gertsenstein, Fahrig, Vandenhoek, Harpal, Eberhardt, Declercq, Pawling, Moons, Collen, Risau, Nagy, "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele," *Nature*, 380(6573):435-439, 1996.
- Champe *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270:1388-1394, 1995.
- Cheng, Huang, Nagane, Ji, Wang, Shih, Arap, Huang, Cavenee, "Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:8502-8507, 1996.
- Claffey, Brown, del Aguila, Tognazzi, Yeo, Manseau, Dvorak, "Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis," *Cancer Res.*, 56:172-181, 1996.
- Clapp *et al.*, "The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis," *Endocrinology*, 133(3):1292-1299, 1993.
- Clauss *et al.*, "The vascular endothelial cell growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities," *J. Biol. Chem.*, 271(30):17629-17634, 1996.
- Connolly, Heuvelman, Nelson, Olander, Eppley, Delfino, Siegel, Leimgruber, Feder, "Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis," *J. Clin. Invest.*, 84:1470-1478, 1989.

## (参考文献の続き)

- Coughlin *et al.*, "Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis," *J. Clin. Invest.*, 101(6):1441-1452, 1998.
- Couper, Bryant, Eldrup-Jorgensen, Bredenberg, Lindner, "Vascular endothelial growth factor increases the mitogenic response to fibroblast growth factor-2 in vascular smooth muscle cells *in vivo* via expression of fms-like tyrosine kinase-1," *Circ. Res.*, 81(6):932-939, 1997.
- Crowther, *In: ELISA Theory and Practice*, Totowa: Humana Press, 1995.
- D'Amato *et al.*, "Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(9):4082-4085, 1994.
- D'Angelo *et al.*, "Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(14):6374-6378, 1995.
- Davis and Yancopoulos, "The angiopoietins: Yin and Yang in angiogenesis," *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 237:173-85, 1999.
- Davis-Smyth, Chen, Park, Presta, Ferrara, "The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade," *EMBO. J.*, 15(18):4919-4927, 1996.
- Detmar, Brown, Claffey, Yeo, Kocher, Jackman, Berse, Dvorak, "Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis," *J. Exp. Med.*, 180:1141-1146, 1994.
- DeVore *et al.*, "Phase I Study of the Antineovascularization Drug CM101," *Clin. Cancer Res.*, 3(3):365-372, 1997.
- deVries, Escobedo, Ueno, Houck, Ferrara, Williams, "The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor," *Science*, 255(5047):989-991, 1992.
- Dvorak, Nagy, Dvorak, "Structure of solid tumors and their vasculature: implications for therapy with monoclonal antibodies," *Cancer Cells*, 3:77-85, 1991a.
- Dvorak, Sioussat, Brown, Berse, Nagy, Sotrel, Manseau, Vandewater, Senger, "Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors - concentration in tumor blood vessels," *J. Exp. Med.*, 174:1275-1278, 1991b.
- Ferrara, "The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis," *Breast Cancer Res. Treat.*, 36:127-137, 1995.

## (参考文献の続き)

- Ferrara, Clapp, Weiner, "The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells," *Endocrinology*, 129(2):896-900, 1991.
- Ferrara, Houck, Jakeman, Winer, Leung, "The vascular endothelial growth factor family of polypeptides," *J. Cell. Biochem.*, 47:211-218, 1991.
- Ferrara, Carver-Moore, Chen, Dowd, Lu, O'Shea, Powell-Braxton, Hillan, Moore, "Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene," *Nature*, 380(6573):439-442, 1996.
- Fidler and Ellis, "The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis [comment]," *Cell*, 79(2):185-188, 1994.
- Fidler, Kumar, Bielenberg, Ellis, "Molecular determinants of angiogenesis in cancer metastasis," *Cancer J. Sci. Am.*, 4 Suppl 1:S58-66, 1998.
- Folkman and Shing, "Angiogenesis," *J. Biol. Chem.*, 267:10931-10934, 1992.
- Folkman *et al.*, "Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone," *Science*, 221:719-725, 1983.
- Fong, Rossant, Gertsenstein, Breitman, "Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium," *Nature*, 376:66-70, 1995.
- Forsythe, Jiang, Iyer, Agani, Leung, Koos, Semenza, "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1," *Mol. Cell. Biol.*, 16:4604-4613, 1996.
- Fotsis *et al.*, "The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth," *Nature*, 368(6468):237-239, 1994.
- Frank, Hubner, Breier, Longaker, Greenhalgh, Werner, "Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing," *J. Biol. Chem.*, 270:12607-12613, 1995.
- Frater-Schroder *et al.*, "Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth *in vitro*, is angiogenic *in vivo*," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(15):5277-5281, 1987.
- Frazier, "Thrombospondins," *Curr. Opin. Cell Biol.*, 3(5):792-799, 1991.
- Fujii *et al.*, "Role of nitric oxide, prostaglandins and tyrosine kinase in vascular endothelial growth factor-induced increase in vascular permeability in mouse skin," *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 356(4):475-480, 1997.

## (参考文献の続き)

- Gagliardi and Collins, "Inhibition of angiogenesis by antiestrogens," *Cancer Res.*, 53(3):533-535, 1993.
- Gagliardi, Hadd, Collins, "Inhibition of angiogenesis by suramin," *Cancer Res.*, 52(18):5073-5075, 1992.
- Gagliardi *et al.*, "Antiangiogenic and antiproliferative activity of suramin analogues," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 41(2):117-124, 1998.
- Gefter *et al.*, "A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells," *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977.
- Gerber, Condorelli, Park, Ferrara, "Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes," *J. Biol. Chem.*, 272:23659-23667, 1997.
- Gerber, Vu, Ryan, Kowalski, Werb, Ferrara, "VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation," *Nature Medicine*, 5(6):623-8, 1999.
- Glennie, *et al.*, "Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments," *J. Immunol.*, 139:2367-2375, 1987.
- Goding, In: *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2nd Edition, Academic Press, Orlando, Fl., pp. 60-61, 65-66, 71-74, 1986.
- Good *et al.*, "A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(17):6624-6628, 1990.
- Grant *et al.*, "Fibronectin fragments modulate human retinal capillary cell proliferation and migration," *Diabetes*, 47(8):1335-1340, 1998.
- Guo, Jia, Song, Warren, Donner, "Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains," *J. Biol. Chem.*, 270:6729-6733, 1995.
- Hanahan and Folkman, "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis," *Cell*, 86(3):353-364, 1996.
- Harada, Mitsuyama, Yoshida, Sakisaka, Taniguchi, Kawaguchi, Ariyoshi, Saiki, Sakamoto, Nagata, Sata, Matsuo, Tanikawa, "Vascular endothelial growth factor in patients with rheumatoid arthritis," *Scandinavian J. Rheumatol.*, 27(5):377-80, 1998.
- Haran *et al.*, "Tamoxifen enhances cell death in implanted MCF7 breast cancer by inhibiting endothelium growth," *Cancer Res.*, 54(21):5511-5514, 1994.
- Hasselaar and Sage, "SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells," *J. Cell Biochem.*, 49(3):272-283, 1992.

## (参考文献の続き)

- Hellerqvist *et al.*, "Antitumor effects of GBS toxin: a polysaccharide exotoxin from group B beta-hemolytic streptococcus," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 120(1-2):63-70, 1993.
- Hiratsuka, Minowa, Kuno, Noda, Shibuya, "Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(16):9349-9354, 1998.
- Hiscox and Jiang, "Interleukin-12, an emerging anti-tumour cytokine," *In Vivo*, 11(2):125-132, 1997.
- Holash *et al.*, "Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF", *Science*, 284:1994-1998, 1999.
- Hong, Nagy, Senger, Dvorak, Dvorak, "Ultrastructural localization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) to the abluminal plasma membrane and vesiculovacuolar organelles of tumor microvascular endothelium," *J. Histochem. Cytochem.*, 43:381-389, 1995.
- Hood and Granger, "Protein kinase G mediates vascular endothelial growth factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells," *J. Biol. Chem.*, 273(36):23504-23508, 1998.
- Hood, Meininger, Ziche, Granger, "VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells," *Am. J. Physiol.*, 274(3 Pt 2):H1054-1058, 1998.
- Hori *et al.*, "Differential effects of angiostatic steroids and dexamethasone on angiogenesis and cytokine levels in rat sponge implants," *Br. J. Pharmacol.*, 118(7):1584-1591, 1996.
- Houck, Ferrara, Winer, Cachianes, Li, Leung, "The vascular endothelial growth factor family: Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA," *Molec. Endo.*, 5(12):1806-1814, 1991.
- Huang, Molema, King, Watkins, Edgington, Thorpe, "Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature," *Science*, 275:547-550, 1997.
- Huang, Gottstein, Brekken, Thorpe, "Expression of soluble VEGF receptor 2 and characterization of its binding by surface plasmon resonance," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252(3):643-648, 1998.
- Huse, Sastry, Iverson, Kang, Altling-Mees, Burton, Benkovic and Lerner, *Science*, 246(4935):1275-1281, 1989.
- Ingber *et al.*, "Angiostatin: Synthetic analogues of fumagillin which inhibit angiogenesis and suppress tumor growth," *Nature*, 48:555-557, 1990.

(参考文献の年表)

- Inoue, Itoh, Ueda, Naruko, Kojima, Komatsu, Doi, Ogawa, Tamura, Takaya, Igaki, Yamashita, Chun, Masatsugu, Becker, Nakao, "Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis", *Circulation*, 98(20):2108-16, 1998.
- Iwamoto *et al.*, "Inhibition of angiogenesis, tumour growth and experimental metastasis of human fibrosarcoma cells IIT1080 by a multimeric form of the laminin sequence Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR)," *Br. J. Cancer*, 73(5):589-595, 1996.
- Jackson *et al.*, "Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein," *Science*, 266(5190):1581-1584, 1994.
- Jendraschak and Sage, "Regulation of angiogenesis by SPARC and angiostatin: implications for tumor cell biology," *Semin. Cancer Biol.*, 7(3):139-146, 1996.
- Joukov, Kumar, Sorsa, Arighi, Weich, Saksela, Alitalo, "A recombinant mutant vascular endothelial growth factor-C that has lost vascular endothelial growth factor receptor-2 binding, activation, and vascular permeability activities," *J. Biol. Chem.*, 273(12):6599-6602, 1998.
- Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, pp 647-669 in particular.
- Kang, Barbas, Janda, Benkovic and Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 88(10):4363-4366, 1991.
- Keck, Hauser, Krivi, Sanzo, Warren, Feder, Connolly, "Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF," *Science*, 246:1309-1312, 1989.
- Kendall and Thomas, "Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10705-10709, 1993.
- Kenyon, Browne, D'Amato, "Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization," *Exp. Eye Res.*, 64(6):971-978, 1997.
- Kerbel, Vitoria-Petit, Okada, Rak, "Establishing a link between oncogenes and tumor angiogenesis," *Mol. Med.*, 4(5):286-295, 1998.
- Keyt *et al.*, "Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis," *J. Biol. Chem.*, 271(10):5638-46, 1996.
- Kim, Li, Houck, Winer, Ferrara, "The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies," *Growth Factors*, 7:53-64, 1992.

## (参考文献の続き)

- Kim, Li, Winer, Armanini, Gillett, Phillips, "Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*," *Nature*, 362:841-844, 1993.
- Kim, Kwak, Ahn, So, Liu, Koh, Koh, "Molecular cloning and characterization of a novel angiopoietin family protein, angiopoietin-3", *FEBS Lett.*, 443(3):353-6, 1999.
- Kleinman *et al.*, "The laminins: a family of basement membrane glycoproteins important in cell differentiation and tumor metastases," *Vitam. Horm.*, 47:161-186, 1993.
- Kohler and Milstein, "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity," *Nature*, 256:495-497, 1975.
- Kohler and Milstein, "Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion," *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519, 1976.
- Konieczny, Bobrzecka, Laidler and Rybarska, "The combination of IgM subunits and proteolytic IgG fragment by controlled formation of interchain disulphides," *Haematologia*, 14(1):95-99, 1981.
- Kondo, Asano, Suzuki, "Significance of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by the antibody," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194:1234-1241, 1993.
- Korpelainen and Alitalo, "Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis," *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10(2):159-164, 1998.
- Kremer, Breier, Risau, Plate, "Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system," *Cancer Res.*, 57:3852-3859, 1997.
- Kroll and Waltenberger, "The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells", *J. Biol. Chem.*, 272:32521-7, 1997.
- Kroll and Waltenberger, "VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR)," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252(3):743-746, 1998.
- Kupppion, Motamed, Sage, "SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells," *J. Biol. Chem.*, 273(45):29635-29640, 1998.
- Kyte and Doolittle, "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein," *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.

(参考文献の続き)

- Landgren, Schiller, Cao, Claesson-Welsh, "Placenta growth factor stimulates MAP kinase and mitogenicity but not phospholipase C-gamma and migration of endothelial cells expressing Flt 1," *Oncogene*, 16(3):359-367, 1998.
- Lane, Iruela-Arispe, Sage, "Regulation of gene expression by SPARC during angiogenesis *in vitro*. Changes in fibronectin, thrombospondin-1, and plasminogen activator inhibitor-1," *J. Biol. Chem.*, 267(23):16736-16745, 1992.
- Lee *et al.*, "Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression," *Endocrinology*, 139(9):3696-3703, 1998.
- Lin, Sankar, Shan, Dewhirst, Polverini, Quinn, Peters, "Inhibition of tumor growth by targeting tumor endothelium using a soluble vascular endothelial growth factor receptor," *Cell Growth Differ.*, 9:49-58, 1998.
- Lin, Buxton, Acheson, Radziejewski, Maisonnier, Yancopoulos, Channon, Hale, Dewhirst, George, Peters, "Anti-angiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95(15):8829-34, 1998.
- Lin, Nguyen, Mendoza, Escandon, Fei, Meng, Modi, "Preclinical pharmacokinetics, interspecies scaling, and tissue distribution of a humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor", *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 288(1):371-8, 1999.
- Lindner and Borden, "Effects of tamoxifen and interferon-beta or the combination on tumor-induced angiogenesis," *Int. J. Cancer*, 71(3):456-461, 1997.
- Lingen, Polverini, Bouck, "Retinoic acid and interferon alpha act synergistically as antiangiogenic and antitumor agents against human head and neck squamous cell carcinoma," *Cancer Res.*, 58(23):5551-5558, 1998.
- Lingen, Polverini, Bouck, "Inhibition of squamous cell carcinoma angiogenesis by direct interaction of retinoic acid with endothelial cells," *Lab. Invest.*, 74(2):476-483, 1996.
- Lin-Ke, Hong-Qu, Nagy, Eckelhoefer, Masse, Dvorak, Dvorak, "Vascular targeting of solid and ascites tumours with antibodies to vascular endothelial growth factor," *Eur. J. Cancer*, 32A(14):2467-2473, 1996.
- Luo, Toyoda, Shibuya, "Differential inhibition of fluid accumulation and tumor growth in two mouse ascites tumors by an antivascular endothelial growth factor/permeability factor neutralizing antibody," *Cancer Res.*, 58(12):2594-2600, 1998a.
- Luo, Yamaguchi, Shinkai, Shitara, Shibuya, "Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors," *Cancer Res.*, 58(12):2652-2660, 1998b.



(参考文献の続き)

- Majewski *et al.*, "Vitamin D3 is a potent inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis," *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 1(1):97-101, 1996.
- Malecaze, Clamens, Simorre-Pinatel, Mathis, Chollet, Favard, Bayard, Plouet, "Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy," *Arch. Ophthalmol.*, 112:1476-1482, 1994.
- Mandriota and Pepper, "Regulation of angiopoietin -2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia," *Circ. Res.*, 83(8):852-9, 1998.
- Manetti *et al.*, "Synthesis and binding mode of heterocyclic analogues of suramin inhibiting the human basic fibroblast growth factor," *Bioorg. Med. Chem.*, 6(7):947-958, 1998.
- Massey *et al.*, *Nature*, 328:457-458, 1987.
- Mazure, Chen, Yeh, Laderoute, Giaccia, "Oncogenic transformation and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression," *Cancer Res.*, 56:3436-3440, 1996.
- McNamara, Harney, Walsh, Redmond, Bouchier-Hayes, "Significance of angiogenesis in cancer therapy [published erratum appears in *Br J Surg.*, Oct;85(10):1449, 1998," *Br. J. Surg.*, 85(8):1044-1055, 1998.
- Mesiano, Ferrara, Jaffe, "Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: inhibition of ascites formation by immunoneutralization," *Am. J. Pathol.*, 153(4):1249-1256, 1998.
- Meyer, Clauss, Lepple-Wienhues, Waltenberger, Augustin, Ziche, Lanz, Buttner, Rziha, Dehio, "A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases," *EMBO J.*, 18:363-74, 1999.
- Millauer, Longhi, Plate, Shawver, Risau, Ullrich, Strawn, "Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types *in vivo*," *Cancer Res.*, 56:1615-1620, 1996.
- Mills, Brooker and Camerini-Otero, "Sequences of human immunoglobulin switch regions: implications for recombination and transcription," *Nucl. Acids Res.*, 18:7305-7316, 1990.
- Moore *et al.*, "Tumor angiogenesis is regulated by CXC chemokines," *J. Lab. Clin. Med.*, 132(2):97-103, 1998.
- Mordenti, Thomsen, Licko, Chen, Meng, Ferrara, "Efficacy and concentration-response of murine anti-VEGF monoclonal antibody in tumor-bearing mice and extrapolation to humans," *Toxicologic Pathology*, 27(1):14-21, 1999.

(参考文献の続き)

- Morrison, Johnson, Herzenberg and Oi, "Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81(21):6851-6855, 1984.
- Morrison, Wims, Kobrin and Oi, "Production of novel immunoglobulin molecules by gene transfection," *Mt. Sinai J. Med.*, 53(3):175, 1986.
- Morrow, Unuvar, King, Mleczko, "Techniques for the production of monoclonal and polyclonal antibodies," In: *Colloidal Gold: Principles, Methods and Applications*, M.A. Hayat (ed.), Orlando: Academic Press, pp. 31-57, 1990.
- Muller, Li, Christinger, Wells, Cunningham, De Vos, "Vascular Endothelial growth factor: Crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:7192-7197, 1997.
- Muller, Chen, Christinger, Li, Cunningham, Lowman, de Vos, "VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface," *Structure*, 6(9):1153-67, 1998.
- Murohara, Horowitz, Silver, Tsurumi, Chen, Sullivan, Isner, "Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin," *Circulation*, 97(1):99-107, 1998.
- Mustonen and Alitalo, "Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis," *J. Cell Biol.*, 129:895-898, 1995.
- Nagashima, Yoshino, Aono, Takai, Sasano, "Inhibitory effects of anti-rheumatic drugs on vascular endothelial growth factor in cultured rheumatoid synovial cells", *Clin. Exp. Immunol.*, 116(2):360-5, 1999.
- Nagler, Feferman, Shoshan, "Reduction in basic fibroblast growth factor mediated angiogenesis *in vivo* by linomide," *Connect Tissue Res.*, 37(1-2):61-68, 1998.
- Nakamura *et al.*, *Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems*, Chapter 27.
- Neufeld, Cohen, Gengrinovitch, Poltorak, "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors," *FASEB J.*, 13(1):9-22, 1999.
- Niida, Kaku, Amano, Yoshida, Kataoka, Nishikawa, Tanne, Maeda, Nishikawa, Kodama, "Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption", *J. Exp. Med.*, 190(2):293-8, 1999.
- Ogawa, Oku, Sawano, Yamaguchi, Yazaki, Shibuya, "A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Fik-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain," *J. Biol. Chem.*, 273(47):31273-31282, 1998.

(参考文献の続き)

- Oikawa *et al.*, "A highly potent antiangiogenic activity of retinoids," *Cancer Lett.*, 48(2):157-162, 1989.
- Olander, Connolly, DeLarco, "Specific binding of vascular permeability factor to endothelial cells," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 175:68-76, 1991.
- O'Reilly *et al.*, "Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma," *Cell*, 79:315-328, 1994.
- O'Reilly *et al.*, "Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth," *Cell*, 88(2):277-285, 1997.
- Papapetropoulos, Garcia-Cardena, Dengler, Maisonpierre, Yancopoulos, Sessa, "Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors", *Lab. Invest.*, 79(2):213-23, 1999.
- Parenti *et al.*, "Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium," *J. Biol. Chem.*, 273(7):4220-4226, 1998.
- Parmley and Smith, "Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes," *Gene*, 73(2):305-318, 1988.
- Pepper *et al.*, "Leukemia inhibitory factor (LIF) inhibits angiogenesis *in vitro*," *J. Cell Sci.*, 108(Pt 1):73-83, 1995.
- Plate, Breier, Weich, Mennel, Risau, "Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible *in vivo* regulatory mechanisms," *Int. J. Cancer*, 59:520-529, 1994.
- Potgens, Westphal, DeWaal, Ruiters, "The role of vascular permeability factor and basic fibroblast growth factor in tumor angiogenesis," *In: Growth Factors in Tumor Angiogenesis*, Berlin: Walter de Gruyter & Co. pp. 57-70, 1995.
- Presta, Chen, O'Connor, Chisholm, Meng, Krummen, Winkler, Ferrara, "Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders," *Cancer Res.*, 57:4593-4599, 1997.
- Quinn *et al.*, CM101, a polysaccharide antitumor agent, does not inhibit wound healing in murine models," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 121(4):253-256, 1995.
- RayChaudhury and D'Amore, "Endothelial cell regulation by transforming growth factor-beta," *J. Cell Biochem.*, 47(3):224-229, 1991.
- Richer and Lo, "Introduction of human DNA into mouse eggs by injection of dissected human chromosome fragments", *Science* 245, 175-177, 1989.

(参考文献の続き)

- Riechmann, Clark, Waldmann and Winter, "Reshaping human antibodies for therapy," *Nature*, 332(6162):323-327, 1988.
- Rouan, Otterness, Cunningham, Holden, Rhodes, "Reversal of colchicine-induced mitotic arrest in Chinese hamster cells with a colchicine-specific monoclonal antibody," *Am. J. Pathol.*, 137(4):779-787, 1990.
- Ryan, Eppler, Hagler, Bruner, Thomford, Hall, Shopp, O'Neill, "Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody", *Toxicologic Pathology*, 27(1):78-86, 1999.
- Sakamoto *et al.*, "Heparin plus cortisone acetate inhibit tumor growth by blocking endothelial cell proliferation," *Canc. J.*, 1:55-58, 1986.
- Saleh, Stacker, Wilks, "Inhibition of growth of C6 glioma cells *in vivo* by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence," *Cancer Res.*, 56:393-401, 1996.
- Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sang, "Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis," *Cell Res.*, 8(3):171-177, 1998.
- Sawano, Takahashi, Yamaguchi, Aonuma, Shibuya, "Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor," *Cell Growth Differ.*, 7(2):213-221, 1996.
- Senger, Galli, Dvorak, Perruzzi, Harvey, Dvorak, "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid," *Science*, 219:983-985, 1983.
- Senger, Perruzzi, Feder, Dvorak, "A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines," *Cancer Res.*, 46:5629-5632, 1986.
- Senger, Connolly, Vandewater, Feder, Dvorak, "Purification and NH2-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor secreted vascular permeability factor," *Cancer Res.*, 50:1774-1778, 1990.
- Shalaby, Rossant, Yamaguchi, Gertsenstein, Wu, Breitman, Schuh, "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice," *Nature*, 376:62-66, 1995.
- Sheibani and Frazier, "Thrombospondin 1 expression in transformed endothelial cells restores a normal phenotype and suppresses their tumorigenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(15):6788-6792, 1995.
- Sheu *et al.*, "Inhibition of angiogenesis *in vitro* and *in vivo*: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti- $\alpha(v)\beta_3$  integrin monoclonal antibody," *Biochim. Biophys. Acta*, 1336(3):445-454, 1997.

## (参考文献の続き)

- Shyu, Manor, Magner, Yancopoulos, Isner, "Direct intramuscular injection of plasmid DNA encoding angiopoietin-1 but not angiopoietin-2 augments revascularization in the rabbit ischemic hindlimb", *Circulation*, 98(19):2081-7, 1998.
- Sideras, Mizuta, Kanamori, Suzuki, Okamoto, Kuze, Ohno, Doi, Fukuhara, Hassan, *et al.*, "Production of sterile transcripts of C gamma genes in an IgM-producing human neoplastic B cell line that switches to IgG-producing cells," *Intl. Immunol.*, 1(6):631-642, 1989.
- Siemeister, Martiny-Baron, Marme, "The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: molecular facts and therapeutic opportunities," *Cancer Metastasis Rev.*, 17(2):241-248., 1998
- Sioussat, Dvorak, Brock, Senger, "Inhibition of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) with antipeptide antibodies," *Arch. Biochem. Biophys.*, 301:15-20, 1993.
- Sipos *et al.*, "Inhibition of tumor angiogenesis," *Ann. NY Acad. Sci.*, 732:263-272, 1994.
- Skobe, Rockwell, Goldstein, Vosseler, Fusenig, "Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion", *Nat. Med.*, 3:1222-7, 1997.
- Soff *et al.*, "Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model," *J. Clin. Invest.*, 96(6):2593-2600, 1995.
- Soker, Takashima, Miao, Neufeld, Klagsbrun, "Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor," *Cell*, 92(6):735-745, 1998.
- Springer, Chen, Kraft, Bednarski, Blau, "VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults," *Mol. Cell*, 2(5):549-558, 1998.
- Stella *et al.*, "Prodrugs: A chemical approach to targeted drug delivery ", *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, Eds. Human Press, 1985, pp 247-267.
- Stratmann, Risau, Plate, "Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis", *Am. J. Pathol.*, 153(5):1333-9, 1998.
- Tada *et al.*, "Inhibition of tubular morphogenesis in human microvascular endothelial cells by co-culture with chondrocytes and involvement of transforming growth factor beta: a model for avascularity in human cartilage," *Biochim. Biophys. Acta*, 1201(2):135-142, 1994.
- Takahashi, Shirasawa, Miyake, Yahagi, Maruyama, Kasahara, Kawamura, Matsumura, Mitarai, Sakai, "Protein tyrosine kinases expressed in glomeruli and cultured

(参考文献の続き)

glomerular cells: Flt-1 and VEGF expression in renal mesangial cells," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 209:218-226, 1995.

Takano *et al.*, "Suramin, an anticancer and angiosuppressive agent, inhibits endothelial cell binding of basic fibroblast growth factor, migration, proliferation, and induction of urokinase-type plasminogen activator," *Cancer Res.*, 54(10):2654-2660, 1994.

Tanaka, Mori, Sakamoto, Makuuchi, Sugimachi, Wands, "Biologic significance of angiopoietin -2 expression in human hepatocellular carcinoma", *J. Clin. Invest.*, 103(3):341-5, 1999.

Tanaka *et al.*, "Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth," *Nat. Med.*, 3(4):437-442, 1997.

Terman, Dougher-Vermazen, Carrion, Dimitrov, Armellino, Gospodarowicz, Bohlen, "Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 187:1579-1586, 1992.

Terman, Khandke, Dougher-Vermazan, Maglione, Lassam, Gospodarowicz, Persico, Bohlen, Eisinger, "VEGF receptor subtypes KDR and FLT1 show different sensitivities to heparin and placenta growth factor," *Growth Factors*, 11(3):187-195, 1994.

Tessler, Rockwell, Hicklin, Cohen, Levi, Witte, Lemischka, Neufeld, "Heparin modulates the interaction of VEGF 165 with soluble and cell associated flk-1 receptors," *J. Biol. Chem.*, 269:12456-12461, 1994.

Thomas, "Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent," *J. Biol. Chem.*, 271:603-606, 1996.

Thorpe *et al.*, "Heparin-Steroid Conjugates: New Angiogenesis Inhibitors with Antitumor Activity in Mice," *Cancer Res.*, 53:3000-3007, 1993.

Tischer, Mitchell, Hartman, Silva, Gospodarowicz, Fiddes, Abraham, "The human gene for vascular endothelial growth factor," *J. Biol. Chem.*, 266:11947-11954, 1991.

Tolsma *et al.*, "Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity," *J. Cell Biol.*, 122(2):497-511, 1993.

Tryggvason, "The laminin family," *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5(5):877-882, 1993.

Valenzuela, Griffiths, Rojas, Aldrich, Jones, Zhou, McClain, Copeland, Gilbert, Jenkins, Huang, Papadopoulos, Maisonpierre, Davis, Yancopoulos, "Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96(5):1904-9, 1999.

van Dijk, Warnaar, van Eendenburg, Thienpont, Braakman, Boot, Fleuren and Bolhuis, "Induction of tumor-cell lysis by bi-specific monoclonal antibodies recognizing renal-cell carcinoma and CD3 antigen," *Int. J. Cancer*, 43:344-349, 1989.

## (参考文献の続き)

- Volpert, Lawler, Bouck, "A human fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental metastases via thrombospondin-1," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(11):6343-6348, 1998.
- Vukanovic *et al.*, "Antiangiogenic effects of the quinoline-3-carboxamide linomide," *Cancer Res.*, 53(8):1833-1837, 1993.
- Waltenberger, Claesson-Welsh, Siegbahn, Shibuya, Heldin, "Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor," *J. Biol. Chem.*, 269(43):26988-26995, 1994.
- Waltenberger, Mayr, Pentz, Hombach, "Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia," *Circulation*, 94:1647-1654, 1996.
- Waltenberger *et al.*, "Suramin is a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor. A contribution to the molecular basis of its antiangiogenic action," *J. Mol. Cell Cardiol.*, 28(7):1523-1529, 1996.
- Wamil *et al.*, "Soluble E-selectin in cancer patients as a marker of the therapeutic efficacy of CM101, a tumor-inhibiting anti-neovascularization agent, evaluated in phase I clinical trial," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 123(3):173-179, 1997.
- Wells, "Starving cancer into submission", *Chem. Biol.*, 5(4):R87-88, 1998.
- Wiesmann, Fuh, Christinger, Eigenbrot, Wells, de Vos, "Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor," *Cell*, 91(5):695-704, 1997.
- Willman *et al.*, "Prodrugs in cancer therapy", *Biochem. Soc. Trans.*, 14:375-382, 1988.
- Winter and Milstein, "Man-made antibodies," *Nature*, 349:293-299, 1991.
- Wolff *et al.*, "Dexamethasone inhibits glioma-induced formation of capillary like structures *in vitro* and angiogenesis *in vivo*," *Klin. Padiatr.*, 209(4):275-277, 1997.
- Yoon *et al.*, "Inhibitory effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumour angiogenesis and metastasis of haematogenous and non- haematogenous tumour cells in mice," *Cancer Lett*, 97(1):83-91, 1995.
- Yoshida *et al.*, "Suppression of hepatoma growth and angiogenesis by a fumagillin derivative TNP470: possible involvement of nitric oxide synthase," *Cancer Res.*, 58(16):3751-3756, 1998.
- Yuan, Chen, Dellian, Safabakhsh, Ferrara, Jain, "Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:14765-14770, 1996.

(参考文献の続き)

Yamamura *et al.*, "Effect of Matrigel and laminin peptide YIGSR on tumor growth and metastasis," *Semin. Cancer Biol.*, 4(4):259-265, 1993.

Zachary, "Vascular endothelial growth factor: how it transmits its signal," *Exp. Nephrol.*, 6(6):480-487, 1998.

Zapata *et al.*, *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062, 1995.

Ziche *et al.*, "Linomide blocks angiogenesis by breast carcinoma vascular endothelial growth factor transfectants," *Br. J. Cancer*, 77(7):1123-1129, 1998.

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、そして本発明の特定の局面をさらに示すために含まれる。本発明は、本明細書中に示される特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせて、これらの図面の1つ以上に対して、参考としてより良く理解され得る。

【配列表】



## SEQUENCE LISTING

<110> BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR CANCER TREATMENT BY SELECTIVELY INHIBITING VEGF

<130> 4001.002510

<140> UNKNOWN

<141> 2000-04-28

<150> 60/131,432

<151> 1999-04-28

<160> 44

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2149

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

cagctgactc aggcaggctc catgctgaac ggtcacacag agaggaaaca ataaatctca 60
gctactatgc aataaatatc tcaagtttta acgaagaaaa acatcattgc agtgaataaa 120
aaaattttta aatttttagaa caaagctaac aaatggctag ttttctatga ttcttcttca 180
aacgctttct ttgaggggga aagagtcaaa caaacagca gttttacctg aaataaagaa 240
ctagtttttag aggtcagaag aaaggagcaa gttttgcgag aggcacggaa ggagtgtgct 300
ggcagtacaa tgacagtttt cctttccttt gctttcctcg ctgccattct gactcacata 360
gggtgcagca atcagcgccg aagtccagaa aacagtggga gaagatataa ccggattcaa 420
catgggcaat gtgcctacac ttctattctt ccagaacacg atggcaactg tcgtgagagt 480
acgacagacc agtacaacac aaacgctctg cagagagatg ctccacacgt ggaaccggat 540
ttctcttccc agaaacttca acatctggaa catgtgatgg aaaattatac tcagtggctg 600
caaaaacttg agaattacat tgtggaaaac atgaagtcgg agatggccca gatacagcag 660
aatgcagttc agaaccacac ggctaccatg ctggagatag gaaccagcct cctctctcag 720
actgcagagc agaccagaaa gctgacagat gttgagaccc aggtactaaa tcaaacttct 780
cgacttgaga tacagctgct ggagaattca ttatccacct acaagctaga gaagcaactt 840
cttcaacaga caaatgaaat cttgaagatc catgaaaaaa acagtttatt agaacataaa 900
atcttagaaa tggaaaggaa acacaaggaa gagttggaca ccttaaaggga agagaaagag 960
aaccttcaag gcttggttac tcgtcaaaac tatataatcc aggagctgga aaagcaatta 1020
aacagagcta ccaccaacaa cagtgtcctt cagaagcagc aactggagct gatggacaca 1080
gtccacaacc ttgtcaatct ttgcactaaa gaagggtgtt tactaaaggg aggaaaaaga 1140
gaggaagaga aaccatttag agactgtgca gatgtatatc aagctgggtt taataaaagt 1200
ggaatctaca ctatttataat taataatatg ccagaaccca aaaagggtgt ttgcaatatg 1260
gatgtcaatg ggggaggttg gactgtaata caacatcgtg aagatggaaag tctagatttc 1320
caaagaggct ggaagggaata taaaatgggt ttggaaaatc cctccggtga atattggctg 1380
gggaatgagt ttatttttgc cattaccagt cagaggcagt acatgctaag aattgagtta 1440
atggactggg aagggaaccg agcctattca cagtatgaca gattccacat aggaaatgaa 1500
aagcaaaact ataggttgta tttaaaaggc cactctggga cagcaggaaa acagagcagc 1560
ctgatcttac acggtgctga ttccagcact aaagatgctg ataatgacaa ctgtatgtgc 1620
aaatgtgccc tcatgttaac agaggatgg tggtttgatg ctgtggccc ctccaatcta 1680
aatggaatgt tctatactgc gggacaaaac catggaaaac tgaatgggat aaagtggcac 1740
tacttcaaag ggcccagtta ctcttacgt tccacaacta tgatgattcg acctttagat 1800
tttgaaaagc gcaatgtcag aagcgattat gaaagcaaca aagaaatccg gagaagctgc 1860
caggtgagaa actgtttgaa aacttcagaa gcaaacaata ttgtctccct tccagcaata 1920

```

```

agtggtagtt atgtgaagtc accaagggtc ttgaccgtga atctggagcc gtttgagttc 1980
acaagagtct ctacttgggg tgacagtgtc cacgtggctc gactatagaa aactccactg 2040
actgtcgggc tttaaaaagg gaagaaactg ctgagcttgc tgtgcttcaa actactactg 2100
gaccttattt tggaactatg gtagccagat gataaatatg gttaatttc 2149

```

<210> 2  
 <211> 498  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 Met Thr Val Phe Leu Ser Phe Ala Phe Leu Ala Ala Ile Leu Thr His  
           1                  5                  10                  15  
 Ile Gly Cys Ser Asn Gln Arg Arg Ser Pro Glu Asn Ser Gly Arg Arg  
                   20                  25                  30  
 Tyr Asn Arg Ile Gln His Gly Gln Cys Ala Tyr Thr Phe Ile Leu Pro  
                   35                  40                  45  
 Glu His Asp Gly Asn Cys Arg Glu Ser Thr Thr Asp Gln Tyr Asn Thr  
           50                  55                  60  
 Asn Ala Leu Gln Arg Asp Ala Pro His Val Glu Pro Asp Phe Ser Ser  
           65                  70                  75                  80  
 Gln Lys Leu Gln His Leu Glu His Val Met Glu Asn Tyr Thr Gln Trp  
                   85                  90                  95  
 Leu Gln Lys Leu Glu Asn Tyr Ile Val Glu Asn Met Lys Ser Glu Met  
           100                  105                  110  
 Ala Gln Ile Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn His Thr Ala Thr Met Leu  
           115                  120                  125  
 Glu Ile Gly Thr Ser Leu Leu Ser Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys  
           130                  135                  140  
 Leu Thr Asp Val Glu Thr Gln Val Leu Asn Gln Thr Ser Arg Leu Glu  
           145                  150                  155                  160  
 Ile Gln Leu Leu Glu Asn Ser Leu Ser Thr Tyr Lys Leu Glu Lys Gln  
                   165                  170                  175  
 Leu Leu Gln Gln Thr Asn Glu Ile Leu Lys Ile His Glu Lys Asn Ser  
           180                  185                  190  
 Leu Leu Glu His Lys Ile Leu Glu Met Glu Gly Lys His Lys Glu Glu  
           195                  200                  205  
 Leu Asp Thr Leu Lys Glu Glu Lys Glu Asn Leu Gln Gly Leu Val Thr  
           210                  215                  220  
 Arg Gln Thr Tyr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Lys Gln Leu Asn Arg Ala  
           225                  230                  235                  240

Thr Thr Asn Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln Leu Glu Leu Met Asp  
 245 250 255  
 Thr Val His Asn Leu Val Asn Leu Cys Thr Lys Glu Gly Val Leu Leu  
 260 265 270  
 Lys Gly Gly Lys Arg Glu Glu Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp  
 275 280 285  
 Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile  
 290 295 300  
 Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn  
 305 310 315 320  
 Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp  
 325 330 335  
 Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser  
 340 345 350  
 Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln  
 355 360 365  
 Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg  
 370 375 380  
 Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn  
 385 390 395 400  
 Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser  
 405 410 415  
 Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn  
 420 425 430  
 Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp  
 435 440 445  
 Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala  
 450 455 460  
 Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys  
 465 470 475 480  
 Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu  
 485 490 495  
 Asp Phe

<210> 3  
 <211> 2269  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

```

tgggttggtg tttatctcct cccagccttg agggagggaa caacactgta ggatctgggg 60
agagaggaac aaaggaccgt gaaagctgct ctgtaaaagc tgacacagcc ctcccagtg 120
agcaggactg ttcttcccac tgcaatctga cagtttactg catgcctgga gagaacacag 180
cagtaaaaac caggtttgct actggaaaaa gaggaagag aagactttca ttgacggacc 240
cagccatggc agcgtagcag ccctgcgttt cagacggcag cagctcggga ctctggacgt 300
gtgtttgccc tcaagtttgc taagctgctg gtttattact gaagaaagaa tgtggcagat 360
tgttttcttt actctgagct gtgatcttgt cttggccgca gcctataaca actttcgga 420
gagcatggac agcataggaa agaagcaata tcagggtccag catgggtcct gcagctacac 480
tttctcctg ccagagatgg acaactgccg ctcttctccc agccccctacg tgtccaatgc 540
tgtgcagagg gacgcgcgcg tcgaatacga tgactcgggtg cagaggctgc aagtgcctga 600
gaacatcatg gaaaacaaca ctcatgggt aatgaagctt gagaattata tccaggacaa 660
catgaagaaa gaaatggtg agatacagca gaatgcagta cagaaccaga cggctgtgat 720
gatagaaata gggaacaacc tgttgaacca aacagctgag caaacgcgga agttaactga 780
tgtggaagcc caagtattaa atcagaccac gagacttgaa cttcagctct tggaaactc 840
ctcttcgaca aacaaattgg aaaaacagat tttggaccag accagtga aaacaaatt 900
gcaagataag aacagtttcc tagaaaagaa ggtgctagct atggaagaca agcaccatcat 960
ccaactacag tcaataaaag aagagaaaga tcagctacag gtgttagtat ccaagcaaaa 1020
ttccatcatt gaagaactag aaaaaaaaaat agtgactgcc acggtgaata attcagttct 1080
tcaaaagcag caacatgac tcattggagac agttaataac ttactgacta tgatgtccac 1140
atcaaaactca gctaaggacc ccactgttgc taaagaagaa caaatcagct tcagagactg 1200
tgctgaagta ttcaaatcag gacacaccac aaatggcatc tacacgttaa cattccctaa 1260
ttctacagaa gagatcaagg cctactgtga catggaagct ggaggaggcg ggtggacaat 1320
tattcagcga cgtgaggatg gcagcgttga ttttcagagg acttggaag aatataaagt 1380
gggatttggt aacccttcag gagaatattg gctgggaaat gagtttgttt cgcaactgac 1440
taatcagcaa cgctatgtgc ttaaaataca ccttaaagac tgggaaggga atgaggctta 1500
ctcattgtat gaacatttct atctctcaag tgaagaactc aattatagga ttcaccttaa 1560
aggacttaca gggacagccg gcaaaataag cagcatcagc caaccaggaa atgattttag 1620
caciaaggat ggagacaacg acaaatgtat ttgcaaatgt tcacaaatgc taacaggagg 1680
ctggtggttt gatgcatgtg gtccttccaa cttgaacgga atgtactatc cacagaggca 1740
gaacacaaat aagttcaacg gcattaaatg gtactactgg aaaggctcag gctattcgct 1800
caaggccaca accatgatga tccgaccagc agatttctaa acatcccagt ccacctgagg 1860
aactgtctcg aactattttc aaagacttaa gccagtgca ctgaaagtca cggctgcgca 1920
ctgtgtcctc ttccaccaca gagggcgtgt gctcgggtgct gacgggaccc acatgtctca 1980
gatttagagcc tgtaaacttt atcacttaaa cttgcatcac ttaacggacc aaagcaagac 2040
cctaaacatc cataattgtg attagacaga acacctatgc aaagatgaac ccgaggctga 2100
gaatcagact gacagtttac agacgtgct gtcacaacca agaattgtat gtgcaagttt 2160
atcagtaaat aactggaaaa cagaacactt atgttatata atacagatca tcttggaact 2220
gcattcttct gagcactgtt tatacactgt gtaaatatcc atatgtcct 2269

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 496

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

```

Met Thr Gln Ile Val Phe Phe Thr Leu Ser Cys Asp Leu Val Leu Ala
  1                      5                      10                     15

Ala Ala Tyr Asn Asn Phe Arg Lys Ser Met Asp Ser Ile Gly Lys Lys
      20                      25                      30

Gln Tyr Gln Val Gln His Gly Ser Cys Ser Tyr Thr Phe Leu Leu Pro
      35                      40                      45

Glu Met Asp Asn Cys Arg Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Val Ser Asn Ala

```

50	55	60
Val Gln Arg Asp Ala Pro Leu Glu Tyr Asp Asp Ser Val Gln Arg Leu 65 70 75 80		
Gln Val Leu Glu Asn Ile Met Glu Asn Asn Thr Gln Trp Leu Met Lys 85 90 95		
Leu Glu Asn Tyr Ile Gln Asp Asn Met Lys Lys Glu Met Val Glu Ile 100 105 110		
Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn Gln Thr Ala Val Met Ile Glu Ile Gly 115 120 125		
Thr Asn Leu Leu Asn Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys Leu Thr Asp 130 135 140		
Val Glu Ala Gln Val Leu Asn Gln Thr Thr Arg Leu Glu Leu Gln Leu 145 150 155 160		
Leu Glu His Ser Leu Ser Thr Asn Lys Leu Glu Lys Gln Ile Leu Asp 165 170 175		
Gln Thr Ser Glu Ile Asn Lys Leu Gln Asp Lys Asn Ser Phe Leu Glu 180 185 190		
Lys Lys Val Leu Ala Met Glu Asp Lys His Ile Ile Gln Leu Gln Ser 195 200 205		
Ile Lys Glu Glu Lys Asp Gln Leu Gln Val Leu Val Ser Lys Gln Asn 210 215 220		
Ser Ile Ile Glu Glu Leu Glu Lys Lys Ile Val Thr Ala Thr Val Asn 225 230 235 240		
Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln His Asp Leu Met Glu Thr Val Asn 245 250 255		
Asn Leu Leu Thr Met Met Ser Thr Ser Asn Ser Ala Lys Asp Pro Thr 260 265 270		
Val Ala Lys Glu Glu Gln Ile Ser Phe Arg Asp Cys Ala Glu Val Phe 275 280 285		
Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile Tyr Thr Leu Thr Phe Pro Asn 290 295 300		
Ser Thr Glu Glu Ile Lys Ala Tyr Cys Asp Met Glu Ala Gly Gly Gly 305 310 315 320		
Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln 325 330 335		
Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu 340 345 350		
Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser Gln Leu Thr Asn Gln Gln Arg		

355                      360                      365  
 Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp Trp Glu Gly Asn Glu Ala Tyr  
 370                      375                      380  
 Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser Ser Glu Glu Leu Asn Tyr Arg  
 385                      390                      395                      400  
 Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser Ser Ile  
 405                      410                      415  
 Ser Gln Pro Gly Asn Asp Phe Ser Thr Lys Asp Gly Asp Asn Asp Lys  
 420                      425                      430  
 Cys Ile Cys Lys Cys Ser Gln Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp  
 435                      440                      445  
 Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Tyr Tyr Pro Gln Arg Gln  
 450                      455                      460  
 Asn Thr Asn Lys Phe Asn Gly Ile Lys Trp Tyr Tyr Trp Lys Gly Ser  
 465                      470                      475                      480  
 Gly Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Ala Asp Phe  
 485                      490                      495  
  
 <210> 5  
 <211> 495  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 5  
 Met Trp Gln Ile Val Phe Phe Thr Leu Ser Cys Asp Leu Val Leu Ala  
 1                      5                      10                      15  
 Ala Ala Tyr Asn Asn Phe Arg Lys Ser Met Asp Ser Ile Gly Lys Lys  
 20                      25                      30  
 Gln Tyr Gln Val Gln His Gly Ser Cys Ser Tyr Thr Phe Leu Leu Pro  
 35                      40                      45  
 Glu Met Asp Asn Cys Arg Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Val Ser Asn Ala  
 50                      55                      60  
 Val Gln Arg Asp Ala Pro Leu Glu Tyr Asp Phe Ser Ser Gln Lys Leu  
 65                      70                      75                      80  
 Gln His Leu Glu His Val Met Glu Asn Tyr Thr Gln Trp Leu Gln Lys  
 85                      90                      95  
 Leu Glu Asn Tyr Ile Val Glu Asn Met Lys Ser Glu Met Ala Gln Ile  
 100                      105                      110  
 Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn His Thr Ala Thr Met Leu Glu Ile Gly  
 115                      120                      125

Thr Ser Leu Leu Ser Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys Leu Thr Asp  
 130 135 140  
 Val Glu Thr Gln Val Leu Asn Gln Thr Ser Arg Leu Glu Ile Gln Leu  
 145 150 155 160  
 Leu Glu Asn Ser Leu Ser Thr Tyr Lys Leu Glu Lys Gln Leu Leu Gln  
 165 170 175  
 Gln Thr Asn Glu Ile Leu Lys Ile His Glu Lys Asn Ser Leu Leu Glu  
 180 185 190  
 His Lys Ile Leu Glu Met Glu Gly Lys His Lys Glu Glu Leu Asp Thr  
 195 200 205  
 Leu Lys Glu Glu Lys Glu Asn Leu Gln Gly Leu Val Thr Arg Gln Thr  
 210 215 220  
 Tyr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Lys Gln Leu Asn Arg Ala Thr Thr Asn  
 225 230 235 240  
 Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln Leu Glu Leu Met Asp Thr Val His  
 245 250 255  
 Asn Leu Val Asn Leu Ser Thr Lys Glu Gly Val Leu Leu Lys Gly Gly  
 260 265 270  
 Lys Arg Glu Glu Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp Val Tyr Gln  
 275 280 285  
 Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile Asn Asn Met  
 290 295 300  
 Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn Gly Gly Gly  
 305 310 315 320  
 Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp Phe Gln Arg  
 325 330 335  
 Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu Tyr  
 340 345 350  
 Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln Arg Gln Tyr  
 355 360 365  
 Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg Ala Tyr Ser  
 370 375 380  
 Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn Tyr Arg Leu  
 385 390 395 400  
 Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser Ser Leu Ile  
 405 410 415  
 Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn Asp Asn Cys  
 420 425 430

Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp Ala  
435 440 445

Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala Gly Gln Asn  
450 455 460

His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys Gly Pro Ser  
465 470 475 480

Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu Asp Phe  
485 490 495

<210> 6  
<211> 381  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
OLIGONUCLEOTIDE

<400> 6  
aagcttcagg tgcaactgca ggagtcctga cctgagctgg taaagcctgg ggcttcagtg 60  
aagatgtcct gcaaggcttc tggatacaca ttcactagct atgttttcca ctgggtgaag 120  
cagaaacctg ggcagggcct tgagtggatt ggatatatta atccttaca tgatgttact 180  
aagtacaatg agaagttaa aggcaaggcc aactgactt cagacaaatc ctccagcaca 240  
gcctacatgg agctcagcag cctgacctct gaggactctg cggcttatta ctgtgcaagc 300  
tactacggtg gtagttacgg atactatgct atggacgact ggggccaagg gaccacgggc 360  
accgtttcct ctggcggtgg c 381

<210> 7  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
PEPTIDE

<400> 7  
Lys Leu Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro  
1 5 10 15  
Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
20 25 30  
Ser Tyr Val Phe His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu  
35 40 45  
Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu  
50 55 60  
Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr  
65 70 75 80



Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Ala Ser Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Tyr Tyr Ala Met Asp  
100 105 110

Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly  
115 120 125

<210> 8  
<211> 347  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
OLIGONUCLEOTIDE

<400> 8  
gacatccagc tgacgcagtc tccagcatcc ctgagtgtgt cagcaggaga gaaggctcact 60  
atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttggcc 120  
tggtatcagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tccacggggc atccactagg 180  
gaatctgggg tccctgatcg ctccacaggc agtggatctg gaaccgattt cactcttacc 240  
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat 300  
cctctcacgt tcggtgctgg caccaagctg gaactgaaac gtctaga 347

<210> 9  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
PEPTIDE

<400> 9  
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Ala Gly  
1 5 10 15  
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser  
20 25 30  
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45  
Pro Pro Lys Leu Leu Ile His Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60  
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80  
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn  
85 90 95  
Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu

100 105 110

Lys Arg Leu  
115

<210> 10  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
PEPTIDE

<400> 10  
Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys  
1 5 10 15  
Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys  
20 25

<210> 11  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
PEPTIDE

<400> 11  
Ala Pro Met Ala Glu Gly Glu Gln Lys Pro Arg Glu Val Val Lys Phe  
1 5 10 15  
Met Asp Val Tyr Lys Arg Ser Tyr Cys  
20 25

<210> 12  
<211> 573  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
OLIGONUCLEOTIDE

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(573)

<400> 12  
atg cat cac cat cac cat cac cat act cat cag gac ttt cag cca gtg 48  
Met His His His His His His His Thr His Gln Asp Phe Gln Pro Val  
1 5 10 15

```

ctc cac ctg gtg gca ctg aac acc ccc ctg tct gga ggc atg cgt ggt 96
Leu His Leu Val Ala Leu Asn Thr Pro Leu Ser Gly Gly Met Arg Gly
      20                25                30

atc cgt gga gca gat ttc cag tgc ttc cag caa gcc cga gcc gtg ggg 144
Ile Arg Gly Ala Asp Phe Gln Cys Phe Gln Gln Ala Arg Ala Val Gly
      35                40                45

ctg tcg ggc acc ttc cgg gct ttc ctg tcc tct agg ctg cag gat ctc 192
Leu Ser Gly Thr Phe Arg Ala Phe Leu Ser Ser Arg Leu Gln Asp Leu
      50                55                60

tat agc atc gtg cgc cgt gct gac cgg ggg tct gtg ccc atc gtc aac 240
Tyr Ser Ile Val Arg Arg Ala Asp Arg Gly Ser Val Pro Ile Val Asn
      65                70                75                80

ctg aag gac gag gtg cta tct ccc agc tgg gac tcc ctg ttt tct ggc 288
Leu Lys Asp Glu Val Leu Ser Pro Ser Trp Asp Ser Leu Phe Ser Gly
      85                90                95

tcc cag ggt caa ctg caa ccc ggg gcc cgc atc ttt tct ttt gac ggc 336
Ser Gln Gly Gln Leu Gln Pro Gly Ala Arg Ile Phe Ser Phe Asp Gly
      100                105                110

aga gat gtc ctg aga cac cca gcc tgg ccg cag aag agc gta tgg cac 384
Arg Asp Val Leu Arg His Pro Ala Trp Pro Gln Lys Ser Val Trp His
      115                120                125

ggc tcg gac ccc agt ggg cgg agg ctg atg gag agt tac tgt gag aca 432
Gly Ser Asp Pro Ser Gly Arg Arg Leu Met Glu Ser Tyr Cys Glu Thr
      130                135                140

tgg cga act gaa act act ggg gct aca ggt cag gcc tcc tcc ctg ctg 480
Trp Arg Thr Glu Thr Thr Gly Ala Thr Gly Gln Ala Ser Ser Leu Leu
      145                150                155                160

tca ggc agg ctc ctg gaa cag aaa gct gcg agc tgc cac aac agc tac 528
Ser Gly Arg Leu Leu Glu Gln Lys Ala Ala Ser Cys His Asn Ser Tyr
      165                170                175

atc gtc ctg tgc att gag aat agc ttc atg acc tct ttc tcc aaa 573
Ile Val Leu Cys Ile Glu Asn Ser Phe Met Thr Ser Phe Ser Lys
      180                185                190

```

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 191

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
PEPTIDE

&lt;400&gt; 13

```

Met His His His His His His His Thr His Gln Asp Phe Gln Pro Val
  1              5              10              15

```

Leu His Leu Val Ala Leu Asn Thr Pro Leu Ser Gly Gly Met Arg Gly  
                     20                    25                    30  
 Ile Arg Gly Ala Asp Phe Gln Cys Phe Gln Gln Ala Arg Ala Val Gly  
                     35                    40                    45  
 Leu Ser Gly Thr Phe Arg Ala Phe Leu Ser Ser Arg Leu Gln Asp Leu  
                     50                    55                    60  
 Tyr Ser Ile Val Arg Arg Ala Asp Arg Gly Ser Val Pro Ile Val Asn  
                     65                    70                    75                    80  
 Leu Lys Asp Glu Val Leu Ser Pro Ser Trp Asp Ser Leu Phe Ser Gly  
                     85                    90                    95  
 Ser Gln Gly Gln Leu Gln Pro Gly Ala Arg Ile Phe Ser Phe Asp Gly  
                     100                    105                    110  
 Arg Asp Val Leu Arg His Pro Ala Trp Pro Gln Lys Ser Val Trp His  
                     115                    120                    125  
 Gly Ser Asp Pro Ser Gly Arg Arg Leu Met Glu Ser Tyr Cys Glu Thr  
                     130                    135                    140  
 Trp Arg Thr Glu Thr Thr Gly Ala Thr Gly Gln Ala Ser Ser Leu Leu  
                     145                    150                    155                    160  
 Ser Gly Arg Leu Leu Glu Gln Lys Ala Ala Ser Cys His Asn Ser Tyr  
                     165                    170                    175  
 Ile Val Leu Cys Ile Glu Asn Ser Phe Met Thr Ser Phe Ser Lys  
                     180                    185                    190

<210> 14  
 <211> 182  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
 PEPTIDE

<400> 14  
 His Ser His Arg Asp Phe Gln Pro Val Leu His Leu Val Ala Leu Asn  
                     1                    5                    10                    15  
 Ser Pro Leu Ser Gly Gly Met Arg Gly Ile Arg Gly Ala Asp Phe Gln  
                     20                    25                    30  
 Cys Phe Gln Gln Ala Arg Ala Val Gly Leu Ala Gly Thr Phe Arg Ala  
                     35                    40                    45  
 Phe Leu Ser Ser Arg Leu Gln Asp Leu Tyr Ser Ile Val Arg Arg Ala  
                     50                    55                    60

Asp Arg Ala Ala Val Pro Ile Val Asn Leu Lys Asp Glu Leu Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Pro Ser Trp Glu Ala Leu Phe Ser Gly Ser Glu Gly Pro Leu Lys Pro  
 85 90 95  
 Gly Ala Arg Ile Phe Ser Phe Asp Gly Lys Asp Val Leu Arg His Pro  
 100 105 110  
 Thr Trp Pro Gln Lys Ser Val Trp His Gly Ser Asp Pro Asn Gly Arg  
 115 120 125  
 Arg Leu Thr Glu Ser Tyr Cys Glu Thr Trp Arg Thr Glu Ala Pro Ser  
 130 135 140  
 Ala Thr Gly Gln Ala Ser Ser Leu Leu Gly Gly Arg Leu Leu Gly Gln  
 145 150 155 160  
 Ser Ala Ala Ser Cys His His Ala Tyr Ile Val Leu Cys Ile Glu Asn  
 165 170 175  
 Ser Phe Met Thr Ala Ser  
 180

<210> 15  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
 PEPTIDE

<400> 15  
 Pro Arg Phe Lys Ile Ile Gly Gly  
 1 5

<210> 16  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
 PEPTIDE

<400> 16  
 Pro Arg Phe Arg Ile Ile Gly Gly  
 1 5

<210> 17  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
PEPTIDE

&lt;400&gt; 17

Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp  
1 5

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
PEPTIDE

&lt;400&gt; 18

Arg Lys Ser Ser Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu  
1 5 10

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
PEPTIDE

&lt;400&gt; 19

Ser Ser Ser Phe Asp Lys Gly Lys Tyr Lys Lys Gly Asp Asp Ala  
1 5 10 15

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
PEPTIDE

&lt;400&gt; 20

Ser Ser Ser Phe Asp Lys Gly Lys Tyr Lys Arg Gly Asp Asp Ala  
1 5 10 15

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
PEPTIDE

<400> 21  
Ile Glu Gly Arg  
1

<210> 22  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
PEPTIDE

<400> 22  
Ile Asp Gly Arg  
1

<210> 23  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
PEPTIDE

<400> 23  
Gly Gly Ser Ile Asp Gly Arg  
1 5

<210> 24  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
PEPTIDE

<400> 24  
Pro Leu Gly Leu Trp Ala  
1 5

<210> 25  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
PEPTIDE

<400> 25  
Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln  
1 5

<210> 26  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
PEPTIDE

<400> 26  
Gly Pro Gln Gly Leu Leu Gly Ala  
1 5

<210> 27  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
PEPTIDE

<400> 27  
Gly Ile Ala Gly Gln  
1 5

<210> 28  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
PEPTIDE

<400> 28  
Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Ile  
1 5

<210> 29  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC



## PEPTIDE

&lt;400&gt; 29

Gly Pro Glu Gly Leu Arg Val Gly  
1 5

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
PEPTIDE

&lt;400&gt; 30

Tyr Gly Ala Gly Leu Gly Val Val  
1 5

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
PEPTIDE

&lt;400&gt; 31

Ala Gly Leu Gly Val Val Glu Arg  
1 5

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
PEPTIDE

&lt;400&gt; 32

Ala Gly Leu Gly Ile Ser Ser Thr  
1 5

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC  
PEPTIDE

```

<400> 33
Glu Pro Gln Ala Leu Ala Met Ser
 1               5

<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:  SYNTHETIC
      PEPTIDE

<400> 34
Gln Ala Leu Ala Met Ser Ala Ile
 1               5

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:  SYNTHETIC
      PEPTIDE

<400> 35
Ala Ala Tyr His Leu Val Ser Gln
 1               5

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:  SYNTHETIC
      PEPTIDE

<400> 36
Met Asp Ala Phe Leu Glu Ser Ser
 1               5

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:  SYNTHETIC
      PEPTIDE

```

# 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

2 C 3 は、A B A E 細胞の V E G F 媒介増殖を阻害する。A B A E 細胞は、種々の示される抗体および 0. 5 nM V E G F の存在下で増殖される。4 日後の増殖は、イエローホルマザンに対する M T S (O w e n' s 試薬) の酵素的変換により、比色定量的に決定された。結果は、V E G F 単独で増殖されたコントロ

ールウェルにおけるホルマザン産生の百分率として示される。背景は、VEGFまたは抗体なしで細胞を増殖することにより決定され、そしてコントロールウェルおよびサンプルウェルからサブトラクトされた。結果は、3つの測定の算術平均を示し、この平均の標準的な偏差は、常に、平均の20%より少なかった。抗VEGF IgG抗体（正の制御としてmAb 4.6.1および負の制御として無関係の特異性のIgG（コントロールIgG））に対する増殖カーブが示された。

### 【図2】

2C3は、ELISAにおいてVEGFR1ではなくVEGFR2に対するVEGF結合をブロックした。ウェルが、VEGFR1 (Flt-1/Fc) またはVEGFR2 (sFlk-1) の細胞外ドメインを用いてコートされ、次いで、1 nMの単独VEGFか、または100 nMまたは1000 nMのいずれかの、示されたIgG存在下で、VEGFと共にインキュベートされた。次いで、プレートを、1  $\mu$ g/mlのウサギ抗VEGF (A-20, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) と共にインキュベートし、そしてペルオキシダーゼ結合体化ヤギ抗ウサギ抗体を用いて発生させた。アッセイを3回実施した。抗体の非存在下で、結合の平均百分率が、標準的な偏差と共に示された。アステリスクは、スチューデント対応T検定により、抗体の非存在下における値とは統計学的に有意に違う ( $p < 0.002$ ) 値を示す。

### 【図3A】

2C3は、ヒト腫瘍異種移植片のインビボ増殖を阻害する。図3A:  $1 \times 10^7$  NCI-H358 NSCLC細胞が、0日目に、nu/nuマウス中に皮下注射された。図3B:  $5 \times 10^6$  A673横紋筋肉腫細胞が、0日目に、nu/nuマウス中に皮下注射された。マウスは、その後、1日1回、週に2回、示されたIgGを腹腔内に注射された。2C3が、一用量100、10、または1  $\mu$ g/注射で与えられ、一方、無関係の特異性のコントロールIgG (図3A) および3E7 (図3B) がまた、100  $\mu$ g/注射で与えられた。腫瘍を、一週間あたり2~3回測定した。平均および標準誤差が、図3Aにおいて、この研究の継続期間に対して示されるが、この研究(26日目)の最終日についてのデー

タは、図3Bにおいて示される。

### 【図3B】

2C3は、ヒト腫瘍異種移植片のインビボ増殖を阻害する。図3A： $1 \times 10^7$  NCI-H358 NSCLC細胞が、0日目に、nu/nuマウス中に皮下注射された。図3B： $5 \times 10^6$  A673横紋筋肉腫細胞が、0日目に、nu/nuマウス中に皮下注射された。マウスは、その後、1日1回、週に2回、示されたIgGを腹腔内に注射された。2C3が、一用量100、10、または $1 \mu\text{g}$ /注射で与えられ、一方、無関係の特異性のコントロールIgG（図3A）および3E7（図3B）がまた、 $100 \mu\text{g}$ /注射で与えられた。腫瘍を、一週間あたり2～3回測定した。平均および標準誤差が、図3Aにおいて、この研究の継続期間に対して示されるが、この研究（26日目）の最終日についてのデータは、図3Bにおいて示される。

### 【図4】

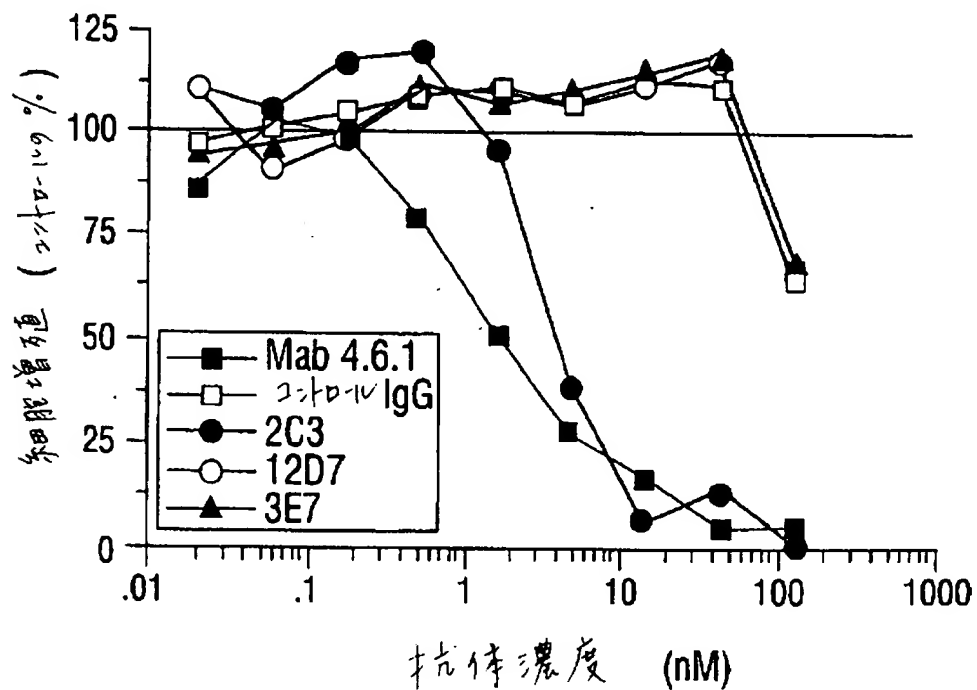
2C3処置は、確立されたヒトNCI-H358 NSCLC腫瘍異種移植片の大きさを減少させる。マウス保有皮下NCI-H358腫瘍（大きさがおよそ $300 \sim 450 \text{ mm}^3$ ）は、示された時点で、 $50 \mu\text{g}$ または $100 \mu\text{g}$ の、2C3（ $n=14$ ）、mAb4.6.1（ $n=5$ ）、3E7（ $n=12$ ）またはコントロールIgG（ $n=9$ ）を用いて、腹腔内で処置される。116日にわたり、SEMと共に、平均の腫瘍体積が示される。

### 【図5】

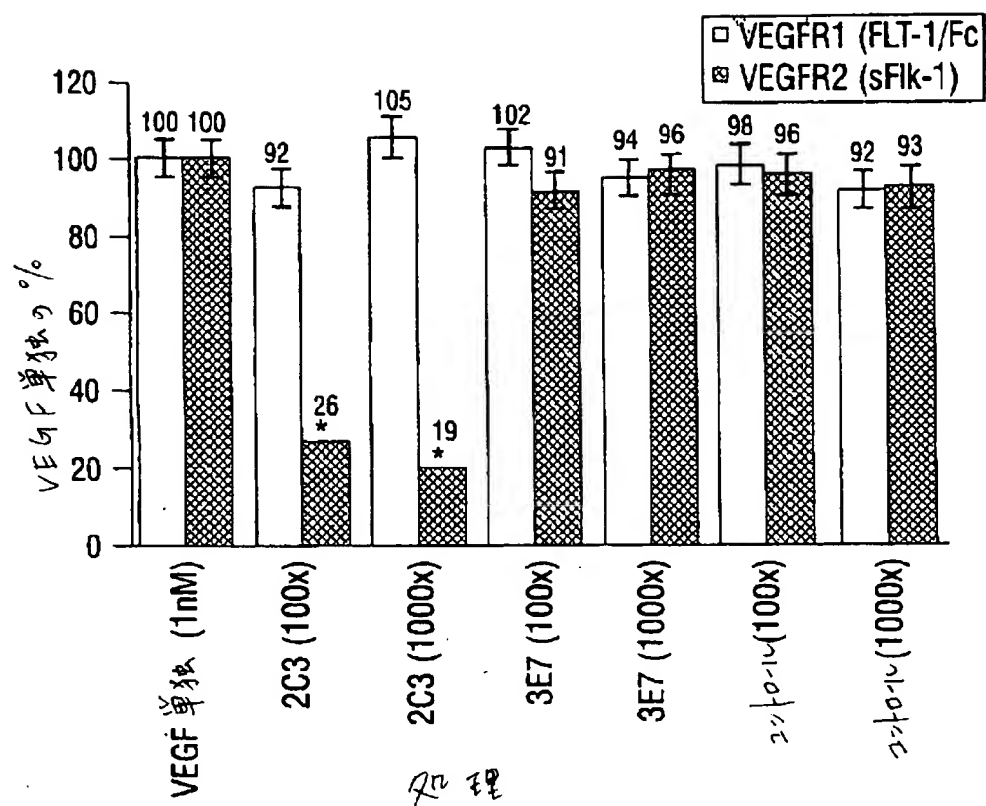
確立されたヒト腫瘍異種移植片の2C3および2E3処理の比較。図5A：マウス保有皮下NCI-H358腫瘍（大きさがおよそ $450 \text{ mm}^3$ ）が、2C3（ $n=6$ ）または3E7（ $n=4$ ）を用いて処置された。処置（T）は、静脈内に与えられる $500 \mu\text{g}$ のIgGからなる最初の処置を除き、腹腔内に与えられる $100 \mu\text{g}$ のIgGである。SEMと共に、平均腫瘍体積が示される。研究の最後に（116日目）、マウスは屠殺され、そして腫瘍が分析され、そして重さが量られる。2C3の処置されたグループに対する平均腫瘍重量は、 $0.054 \text{ g}$ であるが、3E7処置群は、 $0.545 \text{ g}$ の平均腫瘍重量を有した。図5Bは、のマウス保有皮下HT1080腫瘍（大きさがおよそ $200 \sim 250 \text{ mm}^3$ ）

が、 $100\mu\text{g}$ の2C3 ( $n=9$ )、3E7 ( $n=11$ )、コントロールIgG ( $n=11$ )、または生理的食塩水 ( $n=11$ ) を用いて、静脈内に処置された。マウスは、示された(T)のように、一日おきに処置された。非2C3処置マウスは、各群の50%より多くが、大きく、潰瘍化した腫瘍を有することに起因して、26日目に屠殺された。SEと共に、平均腫瘍体積が示される。

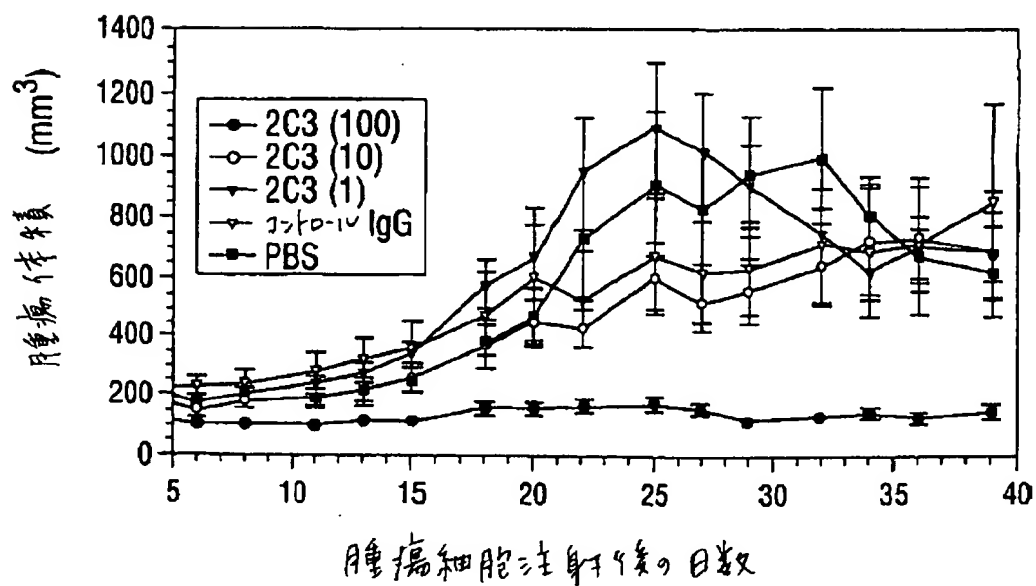
【図1】



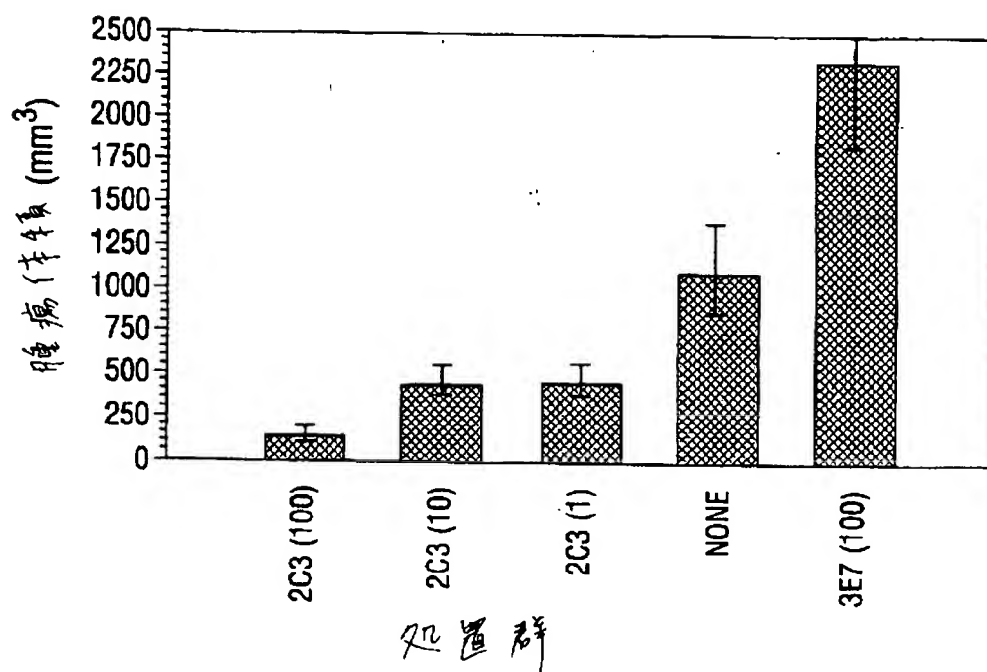
【図2】



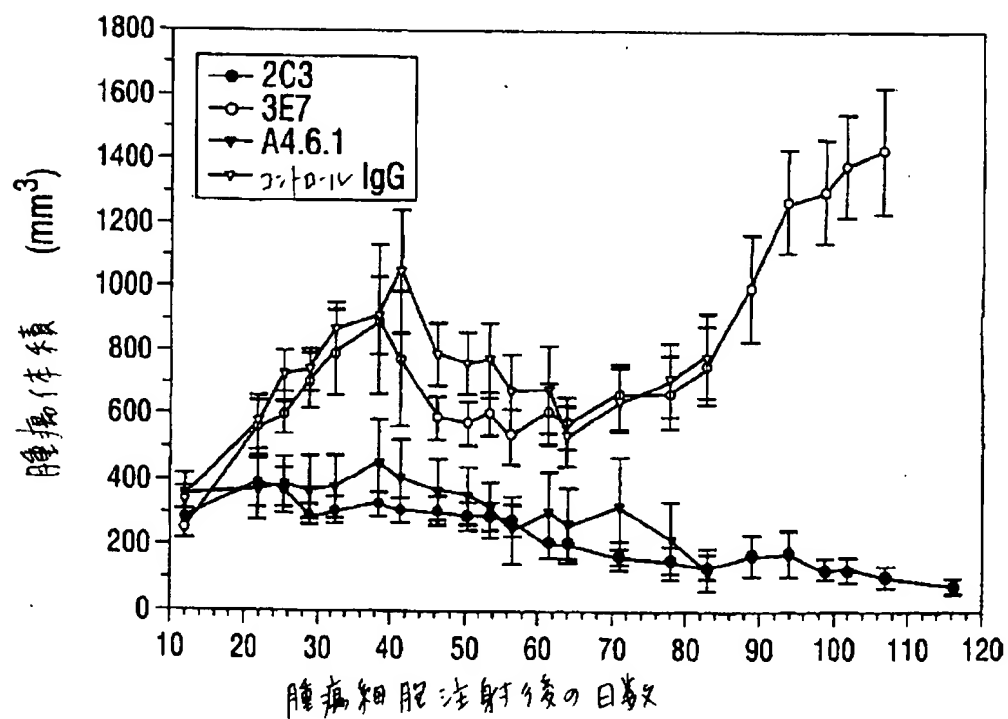
【図3A】



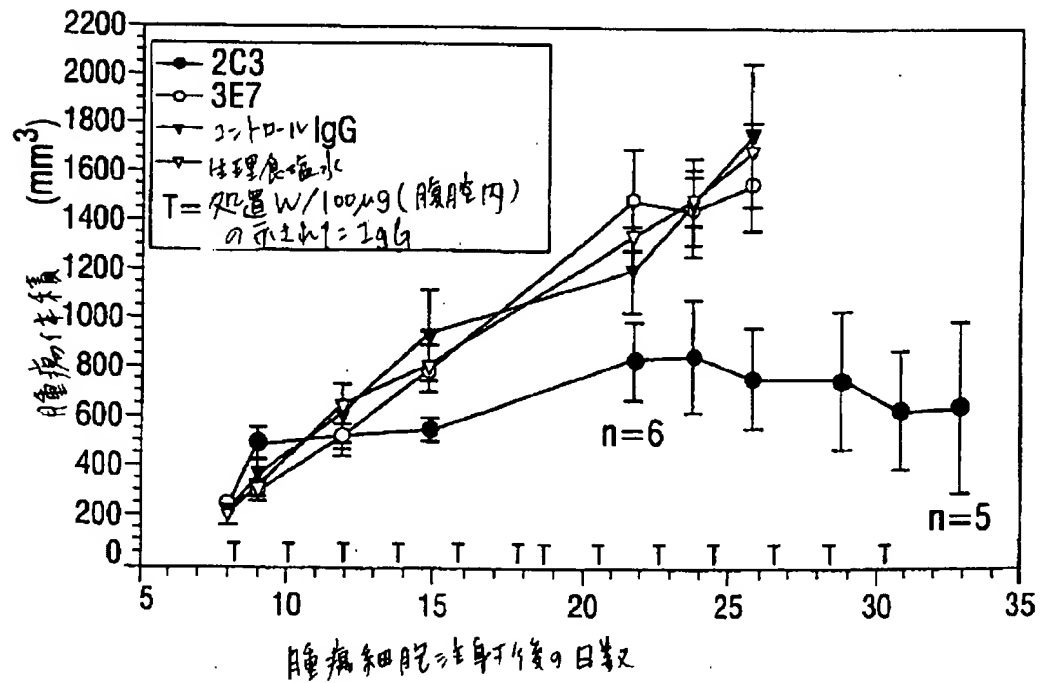
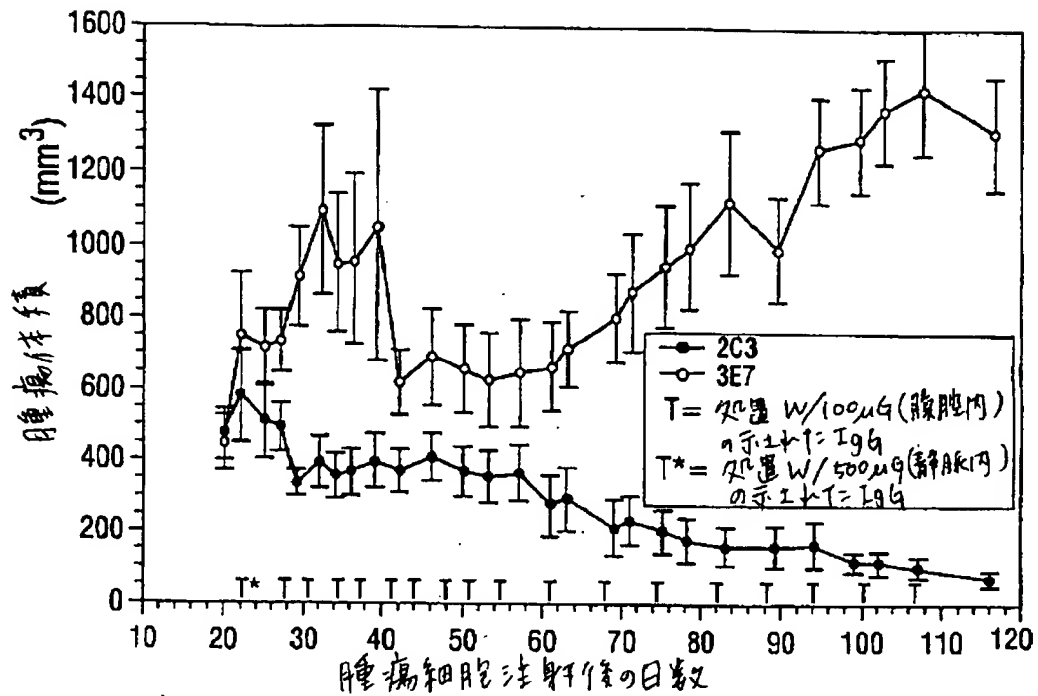
【図3B】



【図4】



【図5】





【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成13年1月11日(2001. 1. 11)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0166

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0166】

コアグリガンドを用いる腫瘍標的化および処置は、以下の特許および特許出願に記載され、それらの各々は、特にコアグリガンドおよび凝固因子に関する本教示をなおさらに補強するために参考として本明細書中に援用される：米国出願第07/846, 349号；同第08/205, 330（米国特許第5, 855, 866号）；同第08/350, 212号（米国特許第5, 965, 132号）；同第08/273, 567号；同第08/482, 369号（米国特許第6, 093, 399号）；同第08/485, 482号；同第08/487, 427号（米国特許第6, 004, 555号）；同第08/479, 733号（米国特許第5, 877, 289号）；および同第08/472, 631；同第08/479, 727号および同第08/481, 904号（米国特許第6, 036, 955号）。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0178

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0178】

以下の特許および特許出願が、コアグリガンド調製、精製および使用（二重特異性抗体コアグリガンドを含む）に関する本教示をいっそうさらに補う目的のために、本明細書中に参考として各々が援用される：米国出願番号07/846, 349；08/205, 330（米国特許第5, 855, 866号）；08/3

50, 212 (米国特許第5, 965, 132号) ; 08/273, 567 ; 08/482, 369 (米国特許第6, 093, 399号 ; 08/485, 482 ; 08/487, 427 (米国特許第6, 004, 555号) ; 08/479, 733 (米国特許第5, 877, 289号) ; 08/472, 631 ; および08/479, 727 および08/481, 904 (米国特許第6, 036, 955号) 。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0423

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0423】

以下の特許および特許出願は、抗体の機能的な抗原結合領域（抗VEGF抗体のscFv、Fv、Fab'、FabおよびF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを含む）の調製および使用に関する本教示をなおさらに補足する目的のために、本明細書中に参考として具体的に援用される：米国特許第5, 855, 866号；同第5, 965, 132号；同第6, 051, 230号；同第6, 004, 555号；および同第5, 877, 289号；ならびに米国特許出願第08/482, 369号（1998年10月20日に特許証発行料金が支払われた）。WO98/45331もまた、抗体の可変領域、超可変領域、および相補性決定領域（CDR）の調製をなおさらに記載および教示することを含む目的のために、本明細書中に参考として援用される。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0427

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0427】

本発明と共に使用するための適度な結合型改変は、サルベージレセプター結合

エピトープを抗体フラグメントに組み込む工程を包含する。これを達成するための技術としては、抗体フラグメントの適切な領域の変異、または抗体フラグメントに付着するペプチドタグとしてのエピトープの組み込みが挙げられる。WO96/32478は、このような技術をさらに説明する目的のために、本明細書中に参考として具体的に援用される。サルベージレセプター結合エピトープは、代表的には、抗体フラグメントの類似の位置に移されるFcドメインの1つまたは2つのループ (loop) 由来の3つ以上のアミノ酸の領域である。WO98/45331のサルベージレセプター結合エピトープは、本発明と共に使用するために、本明細書中に参考として援用される。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0703

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0703】

以下の特許および特許出願は、腫瘍支質を標的する薬剤の調製および使用に関する本発明の教示をなおさらに補完する目的のために、参考として本明細書中に具体的に援用される：米国特許第5,877,289号ならびに米国特許出願第08/482,369号（米国特許第6,093,399号；同第08/485,482号；同第08/487,427号（米国特許第6,004,555号）；同第08/479,733号（米国特許第5,877,289号）；同第08/472,631号および同第08/479,727号および同第08/481,904号（米国特許第6,036,955号）。

【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成13年5月9日(2001. 5. 9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0007】

血管標的アプローチの別の効果的なバージョンは、細胞血管内で発現または吸着されたマーカーに対して凝固因子を標的にすることである(Huangら、1997；米国特許第5,877,289、同第6,004,555号、および同第6,093,399号。毒素よりむしろ凝血薬を腫瘍血管に送達することは、減少した免疫原性のさらなる利点、および毒素の副作用のさらに低い危険性を有する。米国特許第5,877,289号に記載されるように、このような腫瘍特異的「凝血薬」における使用に好ましい凝固因子は、短縮形態のヒト凝固誘導タンパク質、組織因子(TF)、血液凝固の主なイニシエータである。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 00/11367

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C07K16/28 A61K38/18	A61K39/395 A61P35/00
C12N5/20	C12N15/13	G01N33/577
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
BIOSIS, WPI Data, EPO-Internal, PAJ, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BREKKEN ROLF A ET AL: "Vascular endothelial growth factor as a marker of tumor endothelium." CANCER RESEARCH, vol. 58, no. 9, 1 May 1998 (1998-05-01), pages 1952-1959, XP000918910 ISSN: 0008-5472 abstract	1-3, 11, 15, 34, 36, 42, 52-62, 66-68, 72-77
Y	page 1952, column 1, paragraph 2 page 1953, column 1, paragraph 4 -column 2, paragraph 3 page 1953, column 1, paragraph 7 -/-	4-10, 12-14, 16-29, 35, 37-41, 44-51, 63-65, 69-71
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
6 October 2000		19.10.00
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer  Montrone, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 00/11367

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	page 1954, column 1, paragraph 3 page 1954, column 2, paragraph 2 page 1957, column 1, paragraph 2 -column 2, paragraph 2 page 1958, column 1, paragraph 2	
X	MULLER YVES A ET AL: "Vascular endothelial growth factor: Crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 94, no. 14, 1997, pages 7192-7197, XP000918906 1997 ISSN: 0027-8424 abstract page 7195, column 2, paragraph 2 page 7196, column 2, paragraph 1 -page 7197, column 1, paragraph 2	1-3
Y	ORTEGA NATHALIE ET AL: "Signal relays in the VEGF system." FRONTIERS IN BIOSCIENCE, vol. 4, 1 February 1999 (1999-02-01), pages D141-152, XP000940560 abstract page 141 page 144, paragraph 1 page 145 page 146, paragraph 3 page 148, paragraph 4 - paragraph 7 page 150, paragraph 4 -page 151, paragraph 1	16-29
Y	US 5 877 289 A (THORPE PHILIP E ET AL) 2 March 1999 (1999-03-02) cited in the application  abstract column 3, line 40 -column 4, line 20 column 6, line 47 -column 7, line 42 column 9, line 11 -column 11, line 62 column 12, line 20 column 14, line 60 - line 67 column 60, line 64 column 82, line 60 - line 65 column 90, line 20 - line 45  --- -/--	1-9,12, 13, 15-22, 30-46, 51-60, 63-65, 74,76,77

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 00/11367

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>US 5 855 866 A (BURROWS FRANCIS J ET AL) 5 January 1999 (1999-01-05) cited in the application</p> <p>abstract column 4, line 2 - line 51 column 21, line 60 - line 62 column 27, line 16 - line 34 column 36, line 34 - column 37, line 51 column 40, line 1 - line 47</p>	<p>1-9,12, 15-22, 28-46, 50-60, 63-65, 74,76,77</p>
Y	<p>WITTE LARRY ET AL: "Monoclonal antibodies targeting the VEGF receptor-2 (Flk1/KDR) as an anti-angiogenic therapeutic strategy." CANCER AND METASTASIS REVIEWS, vol. 17, no. 2, June 1998 (1998-06), pages 155-161, XP000940443 ISSN: 0167-7659 abstract page 156, column 2, paragraph 4 -page 157, column 2, paragraph 1 page 158, column 1, paragraph 2 -page 159</p>	<p>4-10,35, 69-71</p>
Y	<p>HAISMA H J ET AL: "ANALYSIS OF A CONJUGATE BETWEEN ANTI-CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN MONOCLONAL ANTIBODY AND ALKALINE PHOSPHATASE FOR SPECIFIC ACTIVATION OF THE PRODRUG ETOPOSIDE PHOSPHATE" CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY, vol. 34, no. 5, 1992, pages 343-348, XP000918911 ISSN: 0340-7004 abstract</p>	<p>12-14, 37-41, 44-51</p>
Y	<p>DEONARAIN M P ET AL: "Targeting enzymes for cancer therapy: Old enzymes in new roles." BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 70, no. 5, 1994, pages 786-794, XP000654784 ISSN: 0007-0920 abstract page 786, column 1, paragraph 1 - paragraph 4 page 788; table 1</p>	<p>12-14, 63-65</p>

-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 00/11367

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	<p>GIORGIO NICK A ET AL: "Ellipticine conjugated to anti VEGFR2 monoclonal antibodies as reagents for targeting angiogenesis."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL, no. 41, March 2000 (2000-03), page 387 XP000918901</p> <p>91st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research.; San Francisco, California, USA; April 01-05, 2000, March, 2000 ISSN: 0197-016X abstract</p> <p>----</p>	<p>15-19, 42-46, 52,54-60</p>
P, A	<p>HUBER J ET AL: "Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR-2) antibody therapy combined with conventional chemotherapy inhibits growth of established tumors in mice."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL, no. 41, March 2000 (2000-03), page 567 XP000918903</p> <p>91st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research.; San Francisco, California, USA; April 01-05, 2000, March, 2000 ISSN: 0197-016X abstract</p> <p>-----</p>	<p>15-19, 42-46, 52,54-60</p>



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No.  
PCT/US 00/11367**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 43, 52 to 57 and 73-82 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intr. Int'l. Application No.

PCT/US 00/11367

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5877289 A	02-03-1999	US 5855866 A	05-01-1999
		AU 702250 B	18-02-1999
		AU 2824995 A	09-02-1996
		BR 9508402 A	21-10-1997
		CA 2194369 A	25-01-1996
		EP 0771216 A	07-05-1997
		HU 76970 A	28-01-1998
		JP 10505327 T	26-05-1998
		NZ 288883 A	23-12-1998
		WO 9601653 A	25-01-1996
		US 6036955 A	14-03-2000
		US 6093399 A	25-07-2000
		US 6004555 A	21-12-1999
		US 5965132 A	12-10-1999
		US 5776427 A	07-07-1998
		US 5660827 A	26-08-1997
		US 5863538 A	26-01-1999
		US 6051230 A	18-04-2000
		AU 3737893 A	05-10-1993
		CA 2131528 A	16-09-1993
		EP 0627940 A	14-12-1994
		WO 9317715 A	16-09-1993
		US 6004554 A	21-12-1999
US 5855866 A	05-01-1999	US 5965132 A	12-10-1999
		US 5776427 A	07-07-1998
		US 5660827 A	26-08-1997
		US 5863538 A	26-01-1999
		US 6051230 A	18-04-2000
		US 6036955 A	14-03-2000
		US 5877289 A	02-03-1999
		US 6093399 A	25-07-2000
		US 6004555 A	21-12-1999
		AU 3737893 A	05-10-1993
		CA 2131528 A	16-09-1993
		EP 0627940 A	14-12-1994
		WO 9317715 A	16-09-1993
		US 6004554 A	21-12-1999

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード(参考)
A 6 1 K 47/48		A 6 1 K 47/48	4 C 0 8 5
A 6 1 P 9/10		A 6 1 P 9/10	4 H 0 4 5
27/02		27/02	
35/00		35/00	
43/00	1 0 5	43/00	1 0 5
	1 1 1		1 1 1
	1 2 3		1 2 3
C 0 7 K 16/30		C 0 7 K 16/30	
C 1 2 N 5/02		C 1 2 N 5/02	
5/10	Z N A	C 1 2 P 21/08	
15/02		C 1 2 N 5/00	Z N A B
C 1 2 P 21/08		15/00	C
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW			
(72)発明者 ブレッケン, ロルフ エイ. アメリカ合衆国 ワシントン 98125, シアトル, 25ティーエイチ アベニュー エヌイー 14304			

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA45 BA61 CA04  
CA07 GA01 GA04 GA11 GA18  
HA08 HA11  
4B064 AG26 AG27 DA01 DA14  
4B065 AA90X AA90Y AA93Y AA95X  
AB02 AB04 CA24 CA25 CA44  
4C076 AA95 CC41 CC42 EE59 FF68  
4C084 AA17 NA13 NA15 ZA331  
ZB212 ZB262  
4C085 AA14 AA21 AA25 AA26 AA27  
CC02  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09  
BA42 BA54 CA40 DA75 DA76  
DA86 EA20 EA50 EA51